

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-080283

(43)Date of publication of application : 31.03.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 A61K 38/46
 A61K 48/00
 C07H 21/04
 C07K 14/47
 C12N 1/21
 C12N 9/50
 C12P 21/02
 C12P 21/08
 // (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12N 9/50
 C12R 1:19)
 (C12P 21/08
 C12R 1:91)

(21)Application number : 09-106511

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 24.04.1997

(72)Inventor : YOSHIMURA KOJI
HIKICHI YUICHI
NISHIMURA ATSUSHI

(30)Priority

Priority number : 08104902 Priority date : 25.04.1996 Priority country : JP

(54) NEW PROTEIN AND ITS DNA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new protein composed of a metalloprotease having a specific amino acid sequence and useful for the treatment, prevention, etc., of diseases such as diabetic nephropathy, glomerular nephritis, pulmonary fibrosis, hepatic fibrosis,

Met Asn Cys Cys Gln Arg Pro Leu Gly Phe Ser Leu Phe Asp Thr Val
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Ser Gly Arg Val Leu Gly Ile Ala Glu Val Asp Pro Val Asp Tyr Leu
 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

hepatic cirrhosis, marble bone disease and herniated disk.

SOLUTION: This new protein (salt) is composed of a metalloprotease having an amino acid sequence the same as or essentially the same as the amino acid sequence of the formula. The metalloprotease or its DNA is useful e.g. as an agent for the treatment and prevention of various diseases such as diabetic nephropathy, glomerular nephritis, pulmonary fibrosis, hepatic fibrosis, hepatic cirrhosis, marble bone disease and herniated disk and the protein is useful e.g. for the screening of a compound promoting or inhibiting the protease activity. The protein is produced by cloning a cDNA having a new base sequence from a cDNA library originated from human liver and expressing a matrix metalloprotease which has been found to be a protein for which the cDNA codes.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-80283

(43)公開日 平成10年(1998)3月31日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09	Z NA	9282-4B	C 12 N 15/00	Z NAA
A 61 K 38/46			A 61 K 48/00	ABB
48/00	ABB			ABG
	ABG			ABJ
	ABJ			ABL

審査請求 未請求 請求項の数19 OL (全 42 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平9-106511	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成9年(1997)4月24日	(72)発明者	吉村 浩二 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田 春日ハイツ101号
(31)優先権主張番号	特願平8-104902	(72)発明者	引地 裕一 茨城県つくば市松代四丁目21番2 シャレ ールつくば松代1号棟504
(32)優先日	平8(1996)4月25日	(72)発明者	西村 篤 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田 春日ハイツ1102号
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54)【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

(57)【要約】 (修正有)

【解決手段】新規なメタロプロテアーゼ、その部分ペプチド又はそれらの塩、該タンパク質をコードするDNA、これを含有する組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質又はDNA含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質のプロテアーゼ活性を促進又は阻害する化合物のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、これで得られる化合物、該タンパク質のプロテアーゼ活性を阻害する化合物を含有してなる医薬等。

【効果】上記メタロプロテアーゼ又はそれをコードするDNAは、例えは、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肺纖維症、肝纖維症、肝硬変等の肝疾患、大理石病、椎間板ヘルニア等の種々の疾病的治療・予防剤として使用できる。上記タンパク質はそのプロテアーゼ活性を促進もししくは阻害する化合物又はその塩をスクリーニングするための試薬として有用である。上記抗体は、被検液中の該タンパク質の定量に使用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩。

【請求項2】配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】メタロプロテアーゼである請求項1記載のタンパク質。

【請求項4】請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項5】請求項1記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項6】配列番号：7で表わされる塩基配列を有する請求項5記載のDNA。

【請求項7】配列番号：8で表わされる塩基配列を有する請求項5記載のDNA。

【請求項8】請求項5記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項9】請求項8記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項10】請求項9記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその塩の製造方法。

【請求項11】請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬。

【請求項12】糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、肝硬変、大理石病または椎間板ヘルニアの治療・予防剤である請求項11記載の医薬。

【請求項13】請求項5記載のDNAを含有してなる医薬。

【請求項14】糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、肝硬変、大理石病または椎間板ヘルニアの治療・予防剤である請求項13記載の医薬。

【請求項15】請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項16】請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項17】請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項18】請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キットを用いて

得られる、請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項19】請求項16記載のスクリーニング方法または請求項17記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質、請求項4記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なマトリックス・メタロプロテアーゼおよびそのDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞外マトリックスは、コラーゲンやプロテオグリカン等からなる細胞支持組織であり、発生、炎症、組織修復などに深く関与している。細胞外マトリックスの分解に関与する酵素としては、アスパラギン酸プロテアーゼに属するカテプシンD等、システインプロテアーゼに属するカテプシンB、H、L等、セリンプロテアーゼに属するプラスミン、カリクレイン、好中球エラスター、トリプターゼ、キマーゼ、カテプシンG等、およびメタロプロテアーゼ群が知られている。このうちメタロプロテアーゼ群はマトリックス・メタロプロテアーゼとも呼ばれるように、細胞外マトリックス分解の中心的役割を果たしていることが知られている。コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメリシン、膜結合型マトリックス・メタロプロテアーゼなど13種類のヒト・マトリックス・メタロプロテアーゼ群がクローニングされ、その塩基配列とアミノ酸配列が報告されている [T. Takinoら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、270巻、23013頁、1995年；J. M. P. Freijeら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、269巻、16766頁、1994年；H. Willら、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、231巻、602頁、1995年]。これらの酵素はいずれも亜鉛依存的メタロプロテアーゼであり、亜鉛結合領域であるHis-Glu-X-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Leu-X-His-Serというアミノ酸配列はよく保存され、o-フェナントロリンにより活性が阻害される。これら

の酵素は、活性型酵素のN末端にプロペプチドが結合した活性を有しない潜在型酵素として分泌される。プロペプチドのC末端付近には、Met-Arg-Lys-Pro-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Aspというアミノ酸配列からなる保存領域が存在している。この領域は、「システインスイッチ」と呼ばれ、領域中のシステインが活性中心の亜鉛原子と配位することにより、プロテアーゼ活性を抑制している。潜在型酵素はプロペプチドの切断により活性化を受けるが、TIMPと名付けられた阻害タンパク質が3種類報告されており、厳密な活性の調節が行なわれている。また、試験管内に

においては潜在型酵素はトリプシンやアミノフェニル水銀酢酸などの処理により活性化を受けることが知られている。

【0003】マトリックス・メタロプロテアーゼは、種々のコラーゲン、変成コラーゲンであるゼラチン、種々のプロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチンなどの細胞外マトリックスの分解に関与するだけでなく、他のマトリックスメタロプロテアーゼの活性化や α 1-プロテアーゼインヒビターなどのプロテアーゼ阻害剤の分解を行なう。また、TNF、Fasリガンド、IL-6レセプターなどTNFレセプター等の膜タンパク質および細胞表層タンパク質の可溶化に関与し、その結果として、細胞の死・分化・増殖抑制・増殖および遺伝子発現などを調節することが知られている。マトリックス・メタロプロテアーゼは、生理的には、排卵、発生分化、骨形成、退縮子宮、血管新生などの際に活性が上昇することが知られている。また、病的状態においては、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン（転移・浸潤）、歯周病、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化等において活性が上昇することが知られている。また、逆に肺纖維症、肝纖維症、肝硬変および大理石病等においては活性が低下することが知られている。最近、新たに4番目の膜結合型マトリックス・メタロプロテアーゼがクローニング（X. S. Puenteら、キャンサー・リサーチ、56巻、944頁、1996年）され、新規のマトリックス・メタロプロテアーゼが存在する可能性が示唆されていた。

【0004】

【本発明が解決しようとする課題】新たなヒト由来のマトリックス・メタロプロテアーゼは、マトリックス・メタロプロテアーゼに対して阻害活性または促進活性を有し、マトリックス・メタロプロテアーゼに起因する種々の疾患（例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎など）の予防や治療に役立つ新たな医薬品の開発を可能にする。したがって、本発明の分野では、ヒト由来の新規なマトリックス・メタロプロテアーゼを見いだし、大量に产生する方法の開発が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト肝臓およびラット肝臓由来cDNAライブラリーから、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功し、それにコードされるタンパク質がマトリックス・メタロプロテアーゼであることを見いだした。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩、

（2）配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する

10

20

30

40

50

第（1）項記載のタンパク質、（3）メタロプロテアーゼである第（1）項記載のタンパク質、（4）第（1）項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

（5）第（1）項記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、（6）配列番号：7で表わされる塩基配列を有する第（5）項記載のDNA、（7）配列番号：8で表わされる塩基配列を有する第（5）項記載のDNA、（8）第（5）項記載のDNAを含有する組換えベクター、（9）第（8）項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、（10）第

（9）項記載の形質転換体を培養し、第（1）項記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする第（1）項記載のタンパク質またはその塩の製造方法、（11）第（1）項記載のタンパク質、第

（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬、（12）糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、肝硬変、大理石病または椎間板ヘルニアの治療・予防剤である第（11）項記載の医薬、（13）第（5）項記載のDNAを含有してなる医薬、（14）糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、肝硬変、大理石病または椎間板ヘルニアの治療・予防剤である第（13）項記載の医薬、

【0007】（15）第（1）項記載のタンパク質、第（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、（16）第（1）項記載のタンパク質、第（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする第（1）項記載のタンパク質、第（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、（17）第（1）項記載のタンパク質、第

（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる第（1）項記載のタンパク質、第（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、（18）第（16）項記載のスクリーニング方法または第（17）項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第（1）項記載のタンパク質、第

（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩、および（19）第（16）項記載のスクリーニング方法または第（17）項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第（1）項記載のタンパク質、第（4）項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬を提供する。

【0008】さらに、本発明は、（20）配列番号：3～配列番号：6のいずれかの配列番号で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する第（4）項記載の部分ペプチド、（21）配列番号：7または配列番号：8で表わされる塩基配列とハイ

ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(22)第(21)項記載のDNAを含有する組換えベクター、(23)第(22)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、(24)第(23)項記載の形質転換体を培養し、タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする第(21)項記載のDNAにコードされるタンパク質またはその塩の製造方法、(25)第(24)項記載の製造法で製造されるタンパク質またはその塩、(26)(i)第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に基質を接触させた場合と(ii)第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に基質および試験化合物を接触させた場合における、第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を測定して、比較することを特徴とする第(16)項記載のスクリーニング方法、(27)創傷、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、腫瘍、歯周病、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化、敗血症、多発性硬化症、悪液質、高カルシウム血症、白血病、リンパ腫、糖尿病、全身性エリテマトーデス、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、外傷、火傷、急性膀胱炎、虚血一再灌流傷害、心筋梗塞、鬱血性心不全、臓器移植またはGVHD(移植片対宿主反応)の治療・予防剤である第(19)項記載の医薬、(28)第(16)項もしくは第(26)項記載のスクリーニング方法または第(17)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(29)糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肝纖維症、肺纖維症、肝硬変、大理石病または椎間板ヘルニアの治療・予防剤である第(28)項記載の医薬、(30)第(15)項記載の抗体と、被検液および標識化された第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および(31)被検液と担体上に不溶化した第(15)項記載の抗体および標識化された第(15)項記載の抗体と同時にあるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のタンパク質、第(4)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法を提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の配列番号：1で表わされ

るアミノ酸配列〔図1〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質(以下、本発明のタンパク質と称する)は、ヒトや温血動物(例えは、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えは、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍臍β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、单球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)またはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えは、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脑基底球、海馬、視床、視床下部、大脑皮質、延髓、小脳)、脊髓、下垂体、胃、臍臍、腎臍、肝臍、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(大腸、小腸)、血管、心臍、胸腺、脾臍、頸下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などや、ヒト由来株化細胞(例えは、MEL, M1, CTL-L-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0010】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは80%、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられ、特に、タンパク質の構成アミノ酸配列として少なくとも配列番号：3または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を含有し、全体として配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは80%、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが好ましい。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えは、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列などが用いられる。本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えは、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表

わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましく、特に、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質などが用いられる。実質的に同質の活性としては、例えば、プロテアーゼ活性（例、プロテイナーゼ活性、ペプチダーゼ活性など）などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、プロテアーゼ活性などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。プロテアーゼ活性の活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0011】また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質などのいわゆるムテインも用いられる。上記のようにアミノ酸配列が欠失または置換されている場合、その欠失または置換の位置としては、特に限定されないが、例えば、（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のうち、第98番目～508番目のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列）以外の位置、より好ましくは第93番目～第508番目のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列）以外の位置、（2）配列番号：2で表わされるアミノ酸配列のうち、第99番目～517番目のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列）以外の位置、より好ましくは第94番目～第517番目のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列）以外の位置などが挙げられる。また、欠失・置換の位置としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と配列番号：2で表わされるアミノ酸配列との共通アミノ酸配列以外の位置なども好ましく、特に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のうち、第212番目～225番目のアミノ酸配列（すなわち、

10

20

30

40

50

配列番号：2で表わされるアミノ酸配列のうち、第213番目～226番目のアミノ酸配列）以外の位置などが好適である。

【0012】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルなどが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₅アルキルカルボニル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト肝臓由来のメタロプロテアーゼ〔図1〕などのヒト由来メタロプロテアーゼ、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有するラット肝臓由来のメタロプロテアーゼ〔図6〕などのラット由来メタロプロテアーゼなどが用いられる。

【0013】本発明の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、プロテアーゼ活性など）を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに

好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。本発明の部分ペプチドの具体例としては、例えば、(1)配列番号：3または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチド、(2)配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有し、本発明の配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが用いられる。配列番号：3または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号：3または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは80%、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは80%、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

【0014】ここで、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第98番目のTyr～第508番目のTyrまでのアミノ酸配列を示す。配列番号：4で表わされるアミノ酸配列は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第93番目のGln～第508番目のTyrまでのアミノ酸配列を示す。両アミノ酸配列は、本発明のタンパク質の活性中心部位のアミノ酸配列であり、本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質の成熟体（活性体）のアミノ酸配列である。また、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列は、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の第99番目のTyr～第517番目のTyrまでのアミノ酸配列を示す。配列番号：6で表わされるアミノ酸配列は、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の第94番目のGln～第517番目のTyrまでのアミノ酸配列を示す。両アミノ酸配列は、本発明のタンパク質の活性中心部位のアミノ酸配列であり、本発明の配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質の成熟体（活性体）のアミノ酸配列である。すなわち、本発明のタンパク質は、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質として発見されるが、生体内において、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1番目～97番目または第1番目～92番目のアミノ酸配列部分が切断され、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第98番目～508番目

のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列〔図2〕）または配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第93番目～508番目のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列〔図3〕）を有するペプチドなどが成熟体（活性体）としてプロテアーゼ活性等を発揮する。また、本発明のタンパク質は、例えば、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質として発現されるが、生体内において、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の第1番目～98番目または第1番目～93番目のアミノ酸配列部分が切断され、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の第99番目～517番目のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列）または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列の第94番目～517番目のアミノ酸配列（すなわち、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列）を有するペプチドなどが成熟体（活性体）としてプロテアーゼ活性等を発揮する。
 「実質的に同質の活性」とは前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。
 【0015】また、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、①配列番号：3または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：3または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：3または配列番号：4で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を有するペプチドなども用いられる。さらに、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、①配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（例、1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を有

するペプチドなども用いられる。

【0016】本発明の部分ペプチドは、C末端が通常カルボキシル基 ($-COOH$) またはカルボキシレート ($-COO^-$) であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド ($-CONH_2$) またはエステル ($-COOR$) であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記の本発明のタンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明の部分ペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：3（図2）または配列番号：4（図3）で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる。

【0017】本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、マル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リノゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0018】本発明のタンパク質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニルヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基

を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DC C、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOEt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOEtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0019】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20°C～50°Cの範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

【0020】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-

ーアダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0021】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOEt)とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd 黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中の接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液による酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア

などによるアルカリ処理によっても除去される。

【0022】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別な方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(タンパク質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα-アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0023】本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適當なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス(Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榎原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれ

に準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0024】本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したもの用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号：7で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：7で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性(例、プロテアーゼ活性などの活性)を有するタンパク質をコードするDNA、(2)配列番号：8で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：8で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性(例、プロテアーゼ活性などの活性)を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。配列番号：7で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：7で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号：8で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：8で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0025】ハイブリダイゼーションは、自体公知の方あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナ

トリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70°C、好ましくは約60～65°Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65°Cの場合が最も好ましい。より具体的には、(1)配列番号：1のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：7で表わされる塩基配列を有するDNA〔図4の第95番目～1618番目の塩基配列〕、(2)配列番号：2のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：8で表わされる塩基配列を有するDNA〔図6の第90番目～第1640番目の塩基配列〕などが用いられる。

【0026】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1)①配列番号：7で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、②配列番号：7で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性(例、プロテアーゼ活性などの活性)を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、(2)①配列番号：8で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、②配列番号：8で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性(例、プロテアーゼ活性などの活性)を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0027】より具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：9で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有する部分ペプチドをコードするDNA、②配列番号：10で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：10で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有する部分ペプチドをコードするDNA、③配列番号：11で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：11で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性

を有する部分ペプチドをコードするDNA、④配列番号：12で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：12で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有する部分ペプチドをコードするDNAなどが用いられる。

【0028】配列番号：9または配列番号：10で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：9または配列番号：10で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号：11または配列番号：12で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：11または配列番号：12で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジエントな条件は前記と同様のものが用いられる。より具体的には、①配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列〔図4の第386番目～1618番目の塩基配列〕を有するDNAを含有するDNAなどが、②配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：10で表わされる塩基配列〔図4の第371番目～1618番目の塩基配列〕を有するDNAを含有するDNAなどが、③配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：11で表わされる塩基配列〔図6の第295番目～1640番目の塩基配列〕などが、④配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：12で表わされる塩基配列〔図6の第280番目～1640番目の塩基配列〕などが用いられる。

【0029】本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、（1）本発明のタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または（2）適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別すること、などが挙げられる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従つ

て行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換（欠失・付加・置換）は、公知のキット、例えば、MutanTM-G（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0030】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病原ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_rプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。【0031】発現ベクターには、以上その他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以

下、SV40 or iと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子[メソトレキセート(MTX)耐性]、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp' と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOを用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子で形質転換された細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0032】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクレオツク・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440 (1954)]などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス(Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)]などが用いられる。

【0033】酵母としては、例えば、サッカロマイセスセレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁺, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセスポンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCY2036、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)などが用

いられる。昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盜蛾の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞(Bombyx mori N cell; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J. L.ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる[前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592 (1985)]。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記する), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr-)細胞と略記する), マウスL細胞、マウスA_tT-20, マウスミエローマ細胞、ラットGH3, ヒトFL、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2細胞などが用いられる。これらの中でも、CHO細胞、CHO(dhfr-)細胞、293細胞などが好ましい。

【0034】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972)やジーン(Gene), 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)に記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456 (1973)などに記載の方法に従って行なうことができる。発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法[Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー(Virology) 52, 456-467 (1973)]、電気穿孔法[Niemann, E. et al. エンボ・ジャーナル(EMBO J.) 1, 841-845 (1982)]等が挙げられる。このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベ

クターで形質転換された形質転換体を得ることができる。なお、動物細胞を用いて、本発明のタンパク質を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローニング選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローニング選択を行なうことにより本発明のタンパク質の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、*d h f r* 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、*d h f r* 遺伝子とともに、本発明のタンパク質をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

【0035】上記の形質転換体を本発明のタンパク質をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のタンパク質を生成、蓄積せしめることによって、本発明のタンパク質またはその塩を製造することができる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカ、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出液、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller)、ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や搅拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や搅拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バーカホールダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、

77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。

【0036】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー(Nature), 195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地〔バイロロジー(Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～72時間行ない、必要に応じて通気や搅拌を加える。特に、CHO(*d h f r*⁻)細胞および*d h f r* 遺伝子を選択マーカーとして用いる場合、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0037】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のタンパク質を培養菌体、昆虫あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体、昆虫あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体、昆虫あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体、昆虫あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集め。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離

・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が產生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0038】本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質と略記する）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従つて製造することができる。

【0039】 [モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体產生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体產生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体產生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体產生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体產生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体產生ハイブリドーマを調製することが

できる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミル斯坦の方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体產生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0040】モノクローナル抗体產生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従つて行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0041】 (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換

体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法]に従って行なうことができる。

【0042】 [ポリクローナル抗体の作製] 本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0043】 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられ

る。特に、本発明のDNAの全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）に相補的な塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0044】 本発明のタンパク質は、タンパク質部分の分子量が通常約2～7万、好ましくは約2～6万、活性中心部位の分子量が通常約2～5万のメタロプロテーゼ（好ましくは、ヒト型メタロプロテーゼ）であり、例えば、排卵、発生分化、骨形成、退縮子宮、血管新生などの際に活性が上昇する。また、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン（転移・浸潤）、歯周病、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化などにおいて活性が上昇する。一方、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肺纖維症、肝纖維症、肝硬変、大理石病、椎間板ヘルニアなどにおいて活性が低下する。以下に、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0045】 (1) 本発明のタンパク質が関与する各種疾病的治療・予防剤
メタロプロテーゼをコードするDNAに異常があつたり、欠損している場合、あるいはメタロプロテーゼの発現量や活性が減少している場合、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肺纖維症、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、大理石病、椎間板ヘルニアなどのメタロプロテーゼの発現異常や活性異常に関与する種々の疾病が発症する。したがって、本発明のタンパク質等およびDNAは、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肺纖維症、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、大理石病、椎間板ヘルニアなどのメタロプロテーゼの発現異常や活性異常に関与する種々の疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内においてメタロプロテーゼが減少あるいは欠損しているために、細胞における、メタロプロテーゼ活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ) 本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質等を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、(ハ) 本発明のタンパク質等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質等の役割を十分に、ある

いは正常に発揮させることができる。

【0046】本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子錠やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましく98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0047】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターち、ゼラチン、アルギン酸などの膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリソの甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーの香料などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレンジコール、ポリエチレンジコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム

緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液などの医薬組成物は、通常、適当なアンプルに充填される。本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

【0048】このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病性腎症治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質等を約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによつても異なるが、例えば、椎間板ヘルニア治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0049】（2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質の機能（例、プロテアーゼ活性など）を促進する化合物またはその塩は、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肺纖維症、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、大理石病、椎間板ヘルニアなどの各種疾病的治療・予防剤などの医薬として使用できる。したがつて、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の機能を促進する化合物またはその塩をスクリーニングするための試薬として有用である。一方、本発明のタンパク質等の機能（例、プロテアーゼ活性など）を阻害する化合物またはその塩は、例えば、創傷、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン（転移・浸潤）、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、歯周病、肺纖維症、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化、敗血症、多発性硬化症、悪液質、高カルシウム血症、白血病、リンパ腫、糖尿病、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患、喘息、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎などの免疫疾患、外傷・火傷・急性胰炎などによる全身性炎症反応、虚血・再灌流傷害、心筋梗塞や鬱血性心不全などの循環系疾患、臓器移植やGVHD（移植片対宿主反応）などの各種疾患の治療・予

防腐剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

【0050】すなわち、本発明は、

(1) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の機能(例、プロテアーゼ活性など)を促進する化合物もしくはその塩(以下、促進剤と略記する場合がある)、または本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の機能(例、プロテアーゼ活性など)を阻害する化合物(以下、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(2) (i) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質を接触させた場合と(ii) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合における、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性(例、プロテイナーゼ活性、ペプチダーゼ活性など)を測定して、比較することを特徴とするものである。

【0051】基質としては、本発明のタンパク質等の基質となり得るものであれば何れのものでもよい。例えば、カゼイン、アゾカゼイン、FITC化したカゼイン、放射線標識(例、¹⁴C、³Hなど)したカゼイン、コラーゲン、アゾコラーゲン、FITC化したコラーゲン、放射線標識(例、¹⁴C、³Hなど)したコラーゲン、またはN末端側に(7-メトキシクラリニ-4-イル)アセチル基を、さらにそれより数残基C末側にN³- (2,4-ジニトロフェニル)-2,3-ジアミノプロピオニル基を持ったオリゴペプチド類などが用いられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質等を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質等の標品を調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質等と基質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性は、公知のPER法[F. T. Lundyら、エレクトロフォレシス(Electrophoresis)、16巻、43頁、1995年]に従って測定することができる。例えば、上記(i)

i)の場合におけるプロテアーゼ活性等が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進する化合物として、一方、上記(ii)の場合におけるプロテアーゼ活性等が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を阻害する化合物として選択することができる。

【0052】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

[スクリーニング用試薬]

①測定用緩衝液

pH 8.0のトリス-塩酸バッファー(塩化ナトリウム、塩化カルシウム含有)

②タンパク質標品

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩

③基質

カゼイン20mg/ml

④検出

クマシーブリリアントブルー(CBB)染色

[測定法] 本発明のタンパク質等にアミノフェニル水銀酢酸(最終濃度1mM)を加え、37°C、30分間反応させた後に、PER法(F. T. Lundyら、Electrophoresis、16巻、43頁、1995年)に従ってSDSポリアクリルアミド電気泳動(非還元)を行なった後、ポリアクリルアミドゲルに基質を浸透させ、反応液中で37°C、16時間反応させる。反応後のゲルをCBB染色することによってプロテアーゼ活性を測定する。

【0053】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能を促進または阻害する化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性などの機能を促進する化合物は、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肺纖維症、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、大理石病、椎間板ヘルニアなどの各種疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤として有用である。一方、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性などの機能を阻害する化合物は、例えば、創傷、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン(転移・浸潤)、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、歯周病、肺纖維症、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化、敗血

症、多発性硬化症、悪液質、高カルシウム血症、白血病、リンパ腫、糖尿病、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患、喘息、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎などの免疫疾患、外傷・火傷・急性肺炎などによる全身性炎症反応、虚血一再灌流傷害、心筋梗塞や鬱血性心不全などの循環系疾患、臓器移植やGVHD(移植片対宿主反応)などの各種疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤として有用である。

【0054】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、前述した本発明のタンパク質等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などの製剤とすることができます。得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0055】(3) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、(i)本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、および(ii)被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を認

識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

【0056】また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体(以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある)を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による本発明のタンパク質等の検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、タンパク質量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフィオスファターゼ、ペーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンインソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビシン系を用いることもできる。

【0057】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ず

しも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0058】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0059】これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。

【0060】さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肝纖維症、肝硬変、大理石病、椎間板ヘルニアなどの各種疾病の可能性が高いと診断することができる。一方、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合は、例えば、創傷、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン(転移・浸潤)、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、歯周病、肺纖維症、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化、敗血症、多発性硬化症、悪液質、高カルシウム血症、白血病、リンパ腫、糖尿病、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患、喘息、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎などの免疫疾患、外傷・火傷・急性肺炎などによる全身性炎症反応、虚血-再灌流傷害、心筋梗塞や鬱血性心不全などの循環系疾患、臓器移植やGVHD(移植片対宿主反応)などの各種疾病の可能性が高いと診断することができる。このように、本発明の抗体は、上記疾患の診断剤として有用である。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用するためには、抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0061】(4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができる。例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えれば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomic

s) , 第5巻, 874~879頁(1989年)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , 第86巻, 2766~2770頁(1989年)などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより該mRNAの発現低下が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、大理石病、椎間板ヘルニアなどの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。一方、ノーザンハイブリダイゼーションにより該mRNAの発現過多が検出された場合は、例えば、創傷、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン(転移・浸潤)、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、歯周病、肺纖維症、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化、敗血症、多発性硬化症、悪液質、高カルシウム血症、白血病、リンパ腫、糖尿病、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患、喘息、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎などの免疫疾患、外傷・火傷・急性肺炎などによる全身性炎症反応、虚血一再灌流傷害、心筋梗塞や鬱血性心不全などの循環系疾患、臓器移植やGVHD(移植片対宿主反応)などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、CR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、創傷、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン(転移・浸潤)、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、歯周病、肺纖維症、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化、敗血症、多発性硬化症、悪液質、高カルシウム血症、白血病、リンパ腫、糖尿病、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患、喘息、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎などの免疫疾患、外傷・火傷・急性肺炎などによる全身性炎症反応、虚血一再灌流傷害、心筋梗塞や鬱血性心不全などの循環系疾患、臓器移植やGVHD(移植片対宿主反応)、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、大理石病、椎間板ヘルニアなどの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0062】(5) アンチセンスDNA

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質またはDNAの機能を抑制することができるので、例えば、創傷、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、ガン(転移・浸潤)、肝纖維症、肝硬変などの肝疾患、歯周病、肺纖維症、角膜潰瘍、胃潰瘍、心筋症、動脈瘤、耳硬化症、表皮水泡症、早産、動脈硬化、敗血症、多発性硬化症、悪液質、高カルシウム血症、白血病、リンパ腫、糖尿病、全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患、喘息、アレルギー性鼻炎

やアトピー性皮膚炎などの免疫疾患、外傷・火傷・急性肺炎などによる全身性炎症反応、虚血一再灌流傷害、心筋梗塞や鬱血性心不全などの循環系疾患、臓器移植やGVHD(移植片対宿主反応)などの各種疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。上記アンチセンスDNAを上記の医薬として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして実施することができる。

【0063】(6) 本発明のタンパク質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)(以下、動物と略記する)が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来のプロモーターであって、本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のタンパク質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタスな発現プロモーターも使用することができる。

【0064】受精卵細胞段階におけるDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するよう確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のタンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有する。本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明のDNAが転移された動物は、本発明のタンパク質等が高発現させられているので、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用の動物などとして有用である。本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移

マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、または遺伝子により発現された本発明のタンパク質等が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質等について分析することができる。本発明のタンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質等を単離精製することも可能である。

【0065】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとす*

G l y	: グリシン
A l a	: アラニン
V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基

【0067】また、本明細書中で繁用される置換基、保※ ※護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s	: p-トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
C l ₂ B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル

D N A	: デオキシリボ核酸
c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
R N A	: リボ核酸
m R N A	: メッセンジャー・リボ核酸
d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
A T P	: アデノシン三リン酸
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0066】

Z	: ベンジルオキシカルボニル
C1-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t-ブトキシカルボニル
D N P	: ジニトロフェニル
T r t	: トリチル
B u m	: t-ブトキシメチル
F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
H O O B t	: 3-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン
H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
D C C	: N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
C h a	: シクロヘキシルアラニル
A b u	: アミノ酪酸
A b z	: 2-アミノベンゾイル

【0068】本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼのアミノ酸配列を示す〔図1〕。

〔配列番号：2〕本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼのアミノ酸配列を示す〔図6〕。

〔配列番号：3〕本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す〔図2〕。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から97個のアミノ酸が欠失している。

〔配列番号：4〕本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す〔図3〕。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から92個のアミノ酸が欠失している。

〔配列番号：5〕本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から98個のアミノ酸が欠失している。

〔配列番号：6〕本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のN末端から93個のアミノ酸が欠失している。

【0069】〔配列番号：7〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【0070】〔配列番号：13〕実施例1において、本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕実施例1において、本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕実施例4において、本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの大腸菌用発現ベクターの構築に使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕実施例4において、本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの大腸菌用発現ベクターの構築に使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕実施例9において、本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕実施例9において、本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕実施例9において、本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

【0071】後述の実施例1で得られた形質転換体エシエリヒアコリ (Escherichia coli) DH10B/pT B1921は、平成8年4月22日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-5516として、平成8年4月19日から財團法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO

15950として寄託されている。後述の実施例9で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) DH10B/pTB1982は、平成9年4月9日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5906として、平成9年4月9日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO16074として寄託されている。

【0072】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0073】

【実施例1】ヒト肝臓由来メタロプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニング

cDNAのクローニングは、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム (ギブコビーアールエル社) を用いて行なった。ヒト肝臓由来のcDNAライブラリー (ギブコビーアールエル社) を保有する大腸菌DH12S株をTerrific Broth (1.2 g/l bacto-tryptone (ディフコ社), 2.4 g/l bacto-yeast extract (ディフコ社), 2.3 g/l リン酸一カリウム, 12.5 g/l リン酸二カリウム) で30°Cで16時間培養し、キアジエンプラスミドキット (キアジエン社) を用いて、プラスミドcDNAライブラリーを精製した。精製したプラスミドcDNAライブラリーをGene II, Exo III (いずれもギブコビーアールエル社) によって消化し、一本鎖cDNAライブラリーを作成した。一方、プローブとして、合成オリゴヌクレオチド (配列番号: 13) をcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。プローブは、TdT, ビオチン-14-dCTP (ギブコビーアールエル社) を用いて、3'末端をビオチン化することで標識した。一本鎖cDNAライブラリーを95°Cで1分間処理した後、氷中で急冷し、ビオチン化したプローブを加えて37°Cで1時間、室温でハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーション後、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・マグネットビーズ (ギブコビーアールエル社) を加えて、室温で2分ごとに攪拌しながら30分間放置した。その後、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・マグネットラック (ギブコビーアールエル社) 中に入れ、2分間放置した。上清を捨て、マグネットビーズをジーントラッパー・ポジティブ選択システム・ウォッシュバッファーで洗浄した。このウォッシュバッファーによる洗浄を3回行なった。その後、マグネットラックに入れて放置し、上清を捨て、ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・溶出バッファーを加え、5分間室温で放置した。マグネットラックに入れて5分間放置した後、その上清のDNA

溶液を回収した。

【0074】取得したDNA溶液にプライマーとして合成オリゴヌクレオチド (配列番号: 13)を入れ、95°Cで1分間放置した。ジーントラッパー・ポジティブ選択システム・修復酵素を加え、70°Cで15分間放置して二本鎖DNAを合成した。合成した二本鎖DNAをエレクトロポレーション装置 (バイオ・ラッド社) により、大腸菌DH10B株に導入した。得られた形質転換株を用いて2本のオリゴヌクレオチド (配列番号: 13、配列番号: 14) をプライマーとしてコロニーPCRによるスクリーニングを行なった。PCRにより約510 bpの増幅断片が形成されたコロニーを陽性クローンとして1株選択した。選択した大腸菌を培養後、DNAを抽出し、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA polymerase, FS (パーキンエルマー社) を用いて反応を行ない、377 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社) により、cDNA断片の塩基配列を決定した。取得したクローンは、poly(A)⁺鎖および配列番号: 7で表される1524個の塩基配列を含有する2264個の塩基配列を有していた。このcDNA断片には、配列番号: 1で表される508個のアミノ酸からなる新規メタロプロテアーゼがコードされており、活性中心であるヒスチジン残基も保存されていた。また、公知のヒト由来メタロプロテアーゼ (例、MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-17, MT-MMP-1, MT-MMP-2, MT-MM P3)とのアミノ酸レベルでの相同性は30~36%しかなかった。本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAを保持するプラスミドpTB1921を大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10Bに導入して、形質転換体: 大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B/pTB1921を得た。

【0075】

【実施例2】ヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの一過性発現と培養上清の調製

実施例1で得たpTB1921はすでに発現プラスミドpCMV-SPORT (ギブコビーアールエル社) に組み込まれており、動物細胞における発現に用いられるCOS-7細胞 (財団法人発酵研究所より購入) を血清含有DMEM培地で培養し、遺伝子導入の前日に継代し50%コンフルエントとなったCOS-7細胞を血清不含DMEM培地で洗浄後、2.5mlの無血清培地を添加し、そこに5μgのpTB1921を含むTRANSFECTAM (ニッポンジーン社) 混合液を加えた。37°C, 5%CO₂の条件で4時間培養した後、20%牛血清含有DMEM培地 (2.5ml) を加え、さらに20時間培養した。血清不含DMEM培地に交換し、3日後に細胞培養上清を回収した。また、TRANSFECT

AM溶液のみを加え同様の処理を行なった細胞培養上清をコントロールとして用いた。

【0076】

【実施例3】P E R法によるヒト肝臓由来メタロプロテーゼのメタロプロテーゼ活性の検出

実施例2で得た細胞培養上清にアミノフェニル水銀酢酸(最終濃度1 mM)を加え、37°C、30分間反応させた後に、P E R法(F. T. Lundyら、Electrophoresis、16巻、43頁、1995年)にて活性を検出した。その結果、p TB1921をトランスフェクトしたCOS-7細胞の*10

5'-CCCGCATGCTACCTGTTGCTGGGCCGCTG-3'

(配列番号: 15)

5'-AAGCTGCAGATCTACGGTCTTGCGCCTGCTACA
-3'

(配列番号: 16)

を用いてPCR amplificationキット(宝酒造社製)のプロトコールに従い、PCR反応(94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで1分、25回)を行なった。PCR産物をSpinBind PCR Purification System(FMC社製)を用いて精製後、p CRII(インビトロゲン社製)に挿入し、大腸菌JM109を形質転換した。この大腸菌よりプラスミドを抽出し、ヒト肝臓由来メタロプロテーゼcDNAの塩基配列に誤りのないことを確認した後、Sph IとPst Iで切断し、同様に処理したpQE30(キアゲン社製)とライゲーションした。ライゲーション液を用いて大腸菌JM109(宝酒造社製)を形質転換し、本発明のヒト肝臓由来メタロプロテーゼを発現する大腸菌(Escherichia coli)JM109/pNHMBを取得した。

【0078】

【実施例5】組換え型メタロプロテーゼの大腸菌での発現と精製

実施例4で得られた大腸菌JM109/pNHMBを用いて、本発明の組換え型ヒト肝臓由来メタロプロテーゼを取得した。大腸菌での発現および精製はQIAexpress System(キアゲン社製)添付のプロトコールに準じて行なった。その結果、目的の約46 kDaのメタロプロテーゼはバッファーE(QIAexpress System)で溶出された。次に、分子量12000~14000の透析膜(スペクトラポア社製)を用いて緩衝液[0.2M Tris-HCl(pH9.0), 3mM 2-メルカプトエタノール, 0.3mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィド, 2M尿素, 0.1% Triton X-100]に対して、4°Cにて16時間透析後、緩衝液[0.05M Tris-HCl(pH8.0), 0.15M NaCl, 0.1M尿素, 1mM 2-メルカプトエタノール, 0.1mM 2-ヒドロキシエチルジスルフィド, 0.05% Triton X-100]、緩衝液[0.05M Tris-HCl(pH8.0), 0.15M NaCl, 0.05% Triton X-100]に対し、4°Cにて順次4

20

30

40

50

* 培養上清に、コントロールの培養上清には認められないカゼイン分解活性が認められた。また、この活性はo-フェナヌスロリンにより阻害された。

【0077】

【実施例4】大腸菌発現ベクターの構築

本発明のヒト肝臓由来メタロプロテーゼをコードするcDNAにSph IとPst I切断点を付与するため、実施例1で得たpTB1921をテンプレートとし、2種のプライマー:

5'-CCCGCATGCTACCTGTTGCTGGGCCGCTG-3'

(配列番号: 15)

5'-AAGCTGCAGATCTACGGTCTTGCGCCTGCTACA
-3'

(配列番号: 16)

時間ずつ透析した。このようにして、800 mLの大腸菌培養液から、18.2 mgの組換え型ヒト肝臓由来メタロプロテーゼが取得できた。

【0079】

【実施例6】阻害剤探索系の設定

96穴プレート(フルオロBプレート、大日本製薬製)に30 μLの緩衝液[0.25M Tris-HCl(pH8.0), 5mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 10 μM ZnCl₂]と実施例5で得られた組換え型ヒト肝臓由来メタロプロテーゼ(2.4 mg/ml)を20 μL添加した。37°Cにて10分間プレインキュベーション後、10 μMの基質[DNP-Pro-Cha-Abu-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂, バッケム社製]を100 μL添加することによって酵素反応を開始した。37°Cにて16時間反応後、マイクロプレートリーダー(MTP-32、コロナ電気社製)を用いて、励起波長365 nm、吸収波長460 nmで反応液中の蛍光強度を測定した。無添加の場合の蛍光強度(-20)に対し、再生させた組換え型メタロプロテーゼを添加した場合は、230の蛍光強度を示した。この反応に各種濃度の金属プロテーゼの阻害剤であるアクチノニン(ペプチド研究所製)を添加することによりメタロプロテーゼ活性が阻害され、アクチノニンは約10 μMでこの酵素反応を50%阻害した。このことから、本アッセイ系を用いて、メタロプロテーゼ阻害剤の探索が可能であることを確認した。

【0080】

【実施例7】抗メタロプロテーゼポリクローナル抗体の取得

実施例5で得られた組換え型ヒト肝臓由来メタロプロテーゼ(200 μg)を完全フロイントアジュバントに懸濁し、日本白色ウサギに初回免疫を行なった。以後、2週間毎4回、400 μgの組換え型ヒト肝臓由来メタロプロテーゼを不完全フロイントアジュバントに懸濁後免疫した。最終免疫の1週後に全採血することによ

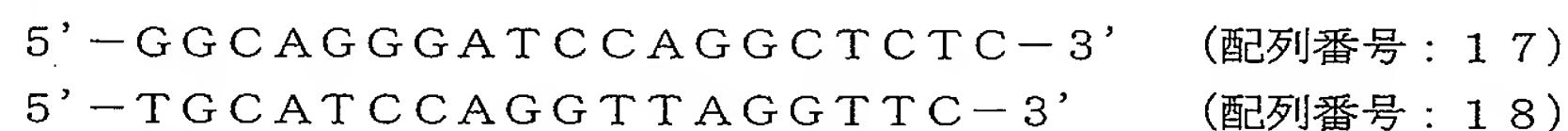
45

り、約50mlの血清が取得できた。抗体価の測定は以下のように行なった。組換え型ヒト肝臓由来メタロプロテアーゼを0.5μg／ウェルとなるように固定化した後、BSAでブロッキングした96穴プレートに、希釈したウサギ血清を添加し、室温で2時間静置した。0.1%Tween-20を含むPBSで洗浄後、抗ウサギIgG-ペーオキシダーゼ(Capel製)を加え2時間静置した。洗浄後、o-フェニレンジアミンと過酸化水素を含むクエン酸-リン酸緩衝液を加え、20分間発色させた。反応を1M硫酸で停止させた後、プレートリーダーを用いて492nmの発色を測定した。その結果、非免疫ウサギの約1万倍の抗体価を示す抗血清が得られた。

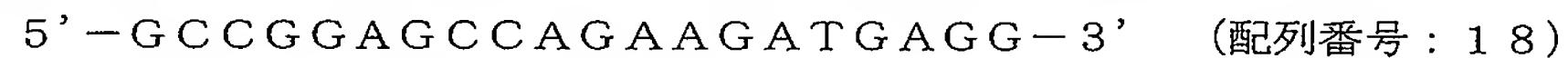
【0081】

【実施例8】ヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの昆虫細胞での発現と抗メタロプロテアーゼ抗体を用いたウエスタンブロッティング

組換えバキュロウイルスの作製と昆虫細胞での発現は、インビトロゲン社のBac-N-Blue Transfection Kitを用いて、添付のプロトコールに従った。メタロプロテアーゼcDNAをpBlueBac4(インビトロゲン社製)のSacI、PstI制限酵素切断点に導入したプラスミドとBac-N-B1*



を用いて、ラット脳および肝臓cDNAライブラリー(ギブコ/ビーアールエル社製)を基質としてPCRを行なった。その結果、ラット肝臓由来メタロプロテアーゼの一部をコードする約400bpの断片が両cDNAライブラリーから増幅された。ラット脳cDNAライプ※30



とラット肝臓由来cDNAライブラリーを用いて、実施例1に記載の方法で取得した。取得したcDNAは2049bpであり、517アミノ酸からなるラット肝臓由来メタロプロテアーゼをコードする1551bpのオープンリーディングフレームとpoly(A)⁺配列を含んでいた[図6]。このラット肝臓由来メタロプロテアーゼは、アミノ酸レベルで、実施例1で得られたヒト肝臓由来メタロプロテアーゼと80%の相同性を示した。本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAを保持するプラスミドpTB1982を大腸菌(Escherichia coli) DH10Bに導入して、形質転換体：大腸菌(Escherichia coli) DH10B/pTB1982を得た。

【0083】

【発明の効果】本発明のタンパク質等またはDNAは、例えば、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、肺纖維症、肝纖維★

配列

Met Asn Cys Gln Gln Leu Trp Leu Gly Phe Leu Leu Pro Met Thr Val

46

*ue(インビトロゲン社製)ウイルスDNAをSf-9昆虫細胞に導入し、細胞内で相同組換えを起こさせた。青いブラークからメタロプロテアーゼcDNAを含む組換えウイルスを選択し、HighFive昆虫細胞(インビトロゲン社製)に感染させた。この昆虫細胞の培養上清を実施例7で得た抗メタロプロテアーゼ抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった。なお、2次抗体には抗ウサギIgG-アルカリホスファターゼコンjugateを、また発色試薬には5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-1-フオスフェートとニトロブルーテトラゾリウム(いずれもプロメガ社製)を用いた。図5に示すように、約44Kdのバンドがメタロプロテアーゼ発現組換えウイルスを感染させたHighFive細胞の培養上清にのみ認められた。以上から、実施例7で作成した抗体は本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼを認識することが確認できた。

【0082】

【実施例9】ラット肝臓由来メタロプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニング

実施例1で得られたヒト肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするcDNAの塩基配列を基に作成した2種の合成プライマー：

5' - GGCAGGGATCCAGGCTCTC-3' (配列番号: 17)

5' - TGCATCCAGGTTAGGTTTC-3' (配列番号: 18)

※ラリーから得たDNA断片をpCR II(インビトロゲン社)にサブクローンし、実施例1に記載の方法で塩基配列を決定した。ラット由来メタロプロテアーゼをコードする全長cDNAは、この400bpの塩基配列を基に作成した合成オリゴヌクレオチドプライマー：

5' - GCCGGAGCCAGAAGATGAGG-3' (配列番号: 18)

★症、肝硬変などの肝疾患、大理石病、椎間板ヘルニアなどの種々の疾病的治療・予防剤などの医薬として使用することができる。また、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用試薬として有用である。さらに、本発明のタンパク質等に対する抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量などに使用することができる。

【0084】

【配列表】

【配列番号: 1】

配列の長さ: 508

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

47		48
Ser Gly Arg Val Leu Gly Leu Ala Glu Val Ala Pro Val Asp Tyr Leu		
20	25	30
Ser Gln Tyr Gly Tyr Leu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Ser Asn Asn Phe		
35	40	45
Lys Pro Glu Asp Ile Thr Glu Ala Leu Arg Ala Phe Gln Glu Ala Ser		
50	55	60
Glu Leu Pro Val Ser Gly Gln Leu Asp Asp Ala Thr Arg Ala Arg Met		
65	70	75
Arg Gln Pro Arg Cys Gly Leu Glu Asp Pro Phe Asn Gln Lys Thr Leu		
85	90	95
Lys Tyr Leu Leu Leu Gly Arg Trp Arg Lys Lys His Leu Thr Phe Arg		
100	105	110
Ile Leu Asn Leu Pro Ser Thr Leu Pro Pro His Thr Ala Arg Ala Ala		
115	120	125
Leu Arg Gln Ala Phe Gln Asp Trp Ser Asn Val Ala Pro Leu Thr Phe		
130	135	140
Gln Glu Val Gln Ala Gly Ala Ala Asp Ile Arg Leu Ser Phe His Gly		
145	150	155
Arg Gln Ser Ser Tyr Cys Ser Asn Thr Phe Asp Gly Pro Gly Arg Val		
165	170	175
Leu Ala His Ala Asp Ile Pro Glu Leu Gly Ser Val His Phe Asp Glu		
180	185	190
Asp Glu Phe Trp Thr Glu Gly Thr Tyr Arg Gly Val Asn Leu Arg Ile		
195	200	205
Ile Ala Ala His Glu Val Gly His Ala Leu Gly Leu Gly His Ser Arg		
210	215	220
Tyr Ser Gln Ala Leu Met Ala Pro Val Tyr Glu Gly Tyr Arg Pro His		
225	230	235
Phe Lys Leu His Pro Asp Asp Val Ala Gly Ile Gln Ala Leu Tyr Gly		
245	250	255
Lys Lys Ser Pro Val Ile Arg Asp Glu Glu Glu Glu Thr Glu Leu		
260	265	270
Pro Thr Val Pro Pro Val Pro Thr Glu Pro Ser Pro Met Pro Asp Pro		
275	280	285
Cys Ser Ser Glu Leu Asp Ala Met Met Leu Gly Pro Arg Gly Lys Thr		
290	295	300
Tyr Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Ser Asp Ser Gly Pro		
305	310	315
Gly Pro Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu Pro Gly Asn		
325	330	335
Leu Asp Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Trp Ile His Phe Phe		
340	345	350
Lys Gly Asp Lys Val Trp Arg Tyr Ile Asn Phe Lys Met Ser Pro Gly		
355	360	365
Phe Pro Lys Lys Leu Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu Asp Ala Ala Leu		
370	375	380
Tyr Trp Pro Leu Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly Ser Gly Tyr		
385	390	395
Trp Gln Trp Asp Glu Leu Ala Arg Thr Asp Phe Ser Ser Tyr Pro Lys		
405	50 410	415

49		50
Pro Ile Lys Gly Leu Phe Thr Gly Val Pro Asn Gln Pro Ser Ala Ala		
420	425	430
Met Ser Trp Gln Asp Gly Arg Val Tyr Phe Lys Gly Lys Val Tyr		
435	440	445
Trp Arg Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val Glu Lys Gly Tyr Pro Arg Asn		
450	455	460
Ile Ser His Asn Trp Met His Cys Arg Pro Arg Thr Ile Asp Thr Thr		
465	470	475
Pro Ser Gly Gly Asn Thr Thr Pro Ser Gly Thr Gly Ile Thr Leu Asp		
485	490	495
Thr Thr Leu Ser Ala Thr Glu Thr Thr Phe Glu Tyr		
500		505

【0085】

【配列番号：2】

配列の長さ：517

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Met Asp Trp Gln Gln Leu Trp Leu Ala Phe Leu Leu Pro Val Thr Val		
1	5	10
Ser Gly Arg Ala Leu Gly Pro Ala Glu Lys Glu Ala Val Val Asp Tyr		
20	25	30
Leu Leu Gln Tyr Gly Tyr Leu Gln Lys Pro Leu Glu Gly Ala Asp Asp		
35	40	45
Phe Arg Leu Glu Asp Ile Thr Glu Ala Leu Arg Thr Phe Gln Glu Ala		
50	55	60
Ser Glu Leu Pro Val Ser Gly Gln Met Asp Asp Ala Thr Arg Ala Arg		
65	70	75
Met Lys Gln Pro Arg Cys Gly Leu Glu Asp Pro Phe Asn Gln Lys Thr		
85	90	95
Leu Lys Tyr Leu Leu Leu Gly His Trp Arg Lys Lys His Leu Thr Phe		
100	105	110
Arg Ile Leu Asn Val Pro Ser Thr Leu Ser Pro Ser Arg Val Arg Ala		
115	120	125
Ala Leu His Gln Ala Phe Lys Tyr Trp Ser Asn Val Ala Pro Leu Thr		
130	135	140
Phe Arg Glu Val Lys Ala Gly Trp Ala Asp Ile Arg Leu Ser Phe His		
145	150	155
Gly Arg Gln Ser Pro Tyr Cys Ser Asn Ser Phe Asp Gly Pro Gly Lys		
165	170	175
Val Leu Ala His Ala Asp Val Pro Glu Leu Gly Ser Val His Phe Asp		
180	185	190
Asn Asp Glu Phe Trp Thr Glu Gly Thr Tyr Gln Gly Val Asn Leu Arg		
195	200	205
Ile Ile Ala Ala His Glu Val Gly His Ala Leu Gly Leu Gly His Ser		
210	215	220
Arg Tyr Thr Gln Ala Leu Met Ala Pro Val Tyr Ala Gly Tyr Gln Pro		
225	230	235
Tyr Phe Arg Leu His Pro Asp Asp Val Ala Gly Ile Gln Ala Leu Tyr		
245	250	255
Gly Lys Arg Arg Pro Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Val Glu Met		
260	250	270

51

52

His Thr Val Ser Thr Val Thr Thr Lys Pro Ser Pro Pro Met Pro Asn Pro		
275	280	285
Cys Ser Ser Glu Val Asp Ala Met Met Leu Gly Pro Arg Gly Lys Thr		
290	295	300
Tyr Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Thr Asp Ser Gly Pro		
305	310	315
Gly Pro Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu Pro Gly Asn		
325	330	335
Leu Asp Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Arg Thr His Phe Phe		
340	345	350
Lys Gly Asn Lys Val Trp Arg Tyr Val Asp Phe Lys Leu Ser Pro Gly		
355	360	365
Phe Pro Met Lys Leu Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu Asp Ala Ala Leu		
370	375	380
Tyr Trp Pro Val Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly Ser Gly Tyr		
385	390	395
Trp Gln Trp Asp Glu Leu Thr Arg Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Pro Lys		
405	410	415
Pro Ile Lys Glu Leu Phe Thr Gly Val Pro Asp Gln Pro Ser Ala Ala		
420	425	430
Met Ser Trp Gln Asp Gly Gln Val Tyr Phe Lys Gly Lys Glu Tyr		
435	440	445
Trp Arg Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val Ala Lys Gly Tyr Pro Arg Asn		
450	455	460
Thr Thr His Trp Met His Cys Ser Pro Arg Thr Pro Asp Thr Asn Ser		
465	470	475
Leu Thr Gly Asp Val Thr Thr Pro Ala Thr Val Glu Ser Val Leu Asp		
485	490	495
Val Pro Ser Ala Thr Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Ala Asn Val		
500	505	510
Thr Leu Leu Gly Ala		
515		

【0086】

* 配列の型：アミノ酸

【配列番号：3】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：411

* 配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Leu Leu Leu Gly Arg Trp Arg Lys Lys His Leu Thr Phe Arg Ile		
1	5	10
Leu Asn Leu Pro Ser Thr Leu Pro Pro His Thr Ala Arg Ala Ala Leu		
20	25	30
Arg Gln Ala Phe Gln Asp Trp Ser Asn Val Ala Pro Leu Thr Phe Gln		
35	40	45
Glu Val Gln Ala Gly Ala Ala Asp Ile Arg Leu Ser Phe His Gly Arg		
50	55	60
Gln Ser Ser Tyr Cys Ser Asn Thr Phe Asp Gly Pro Gly Arg Val Leu		
65	70	75
Ala His Ala Asp Ile Pro Glu Leu Gly Ser Val His Phe Asp Glu Asp		
85	90	95
Glu Phe Trp Thr Glu Gly Thr Tyr Arg Gly Val Asn Leu Arg Ile Ile		
100	150	110

53

54

Ala Ala His Glu Val Gly His Ala Leu Gly Leu Gly His Ser Arg Tyr
 115 120 125
 Ser Gln Ala Leu Met Ala Pro Val Tyr Glu Gly Tyr Arg Pro His Phe
 130 135 140
 Lys Leu His Pro Asp Asp Val Ala Gly Ile Gln Ala Leu Tyr Gly Lys
 145 150 155 160
 Lys Ser Pro Val Ile Arg Asp Glu Glu Glu Glu Thr Glu Leu Pro
 165 170 175
 Thr Val Pro Pro Val Pro Thr Glu Pro Ser Pro Met Pro Asp Pro Cys
 180 185 190
 Ser Ser Glu Leu Asp Ala Met Met Leu Gly Pro Arg Gly Lys Thr Tyr
 195 200 205
 Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Ser Asp Ser Gly Pro Gly
 210 215 220
 Pro Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu Pro Gly Asn Leu
 225 230 235 240

Asp Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Trp Ile His Phe Phe Lys
 245 250 255
 Gly Asp Lys Val Trp Arg Tyr Ile Asn Phe Lys Met Ser Pro Gly Phe
 260 265 270
 Pro Lys Lys Leu Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu Asp Ala Ala Leu Tyr
 275 280 285
 Trp Pro Leu Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly Ser Gly Tyr Trp
 290 295 300
 Gln Trp Asp Glu Leu Ala Arg Thr Asp Phe Ser Ser Tyr Pro Lys Pro
 305 310 315 320
 Ile Lys Gly Leu Phe Thr Gly Val Pro Asn Gln Pro Ser Ala Ala Met
 325 330 335
 Ser Trp Gln Asp Gly Arg Val Tyr Phe Phe Lys Gly Lys Val Tyr Trp
 340 345 350
 Arg Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val Glu Lys Gly Tyr Pro Arg Asn Ile
 355 360 365
 Ser His Asn Trp Met His Cys Arg Pro Arg Thr Ile Asp Thr Thr Pro
 370 375 380
 Ser Gly Gly Asn Thr Thr Pro Ser Gly Thr Gly Ile Thr Leu Asp Thr
 385 390 395 400
 Thr Leu Ser Ala Thr Glu Thr Thr Phe Glu Tyr
 405 410

【0087】

*配列の型：アミノ酸

【配列番号：4】

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：416

* 配列の種類：ペプチド

配列

Gln Lys Thr Leu Lys Tyr Leu Leu Leu Gly Arg Trp Arg Lys Lys His
 1 5 10 15
 Leu Thr Phe Arg Ile Leu Asn Leu Pro Ser Thr Leu Pro Pro His Thr
 20 25 30
 Ala Arg Ala Ala Leu Arg Gln Ala Phe Gln Asp Trp Ser Asn Val Ala
 35 40 45
 Pro Leu Thr Phe Gln Glu Val Gln A50 Gly Ala Ala Asp Ile Arg Leu

55	55	60	56
Ser	Phe	His	Gly
Arg	Gln	Ser	Ser
Tyr	Cys	Ser	Asn
Asn	Thr	Phe	Asp
Thr			Gly
65	70	75	80
Pro	Gly	Arg	Val
Leu	Ala	His	Ala
Asp	Ile	Pro	Glu
Ile			Leu
Gly			Gly
Val			Ser
85	90	95	
His	Phe	Asp	Glu
Glu	Asp	Glu	Phe
Phe	Trp	Thr	Glu
Thr	Gly	Arg	Tyr
Gly	Val	Gly	Val
100	105	110	
Asn	Leu	Arg	Ile
Ile	Ala	Ala	His
Glu	Val	Gly	His
His	Ala	Leu	Gly
115	120	125	Leu
Gly	His	Ser	Arg
Tyr	Ser	Gln	Ala
Ala	Leu	Met	Pro
130	135	140	Val
Tyr	Arg	Pro	Tyr
Pro	Phe	Lys	Leu
His	His	Pro	Asp
145	150	155	Asp
Ala	Leu	Tyr	Gly
Lys	Lys	Ser	Pro
165	170	175	Val
Glu	Thr	Glu	Leu
Leu	Pro	Thr	Val
Pro	Pro	Pro	Val
180	185	190	Pro
Met	Pro	Asp	Ser
Pro	Cys	Ser	Pro
195	200	205	Pro
Arg	Gly	Lys	Thr
Tyr	Ala	Phe	Lys
Gly	Asp	Tyr	Val
210	215	220	Trp
Asp	Ser	Gly	Thr
Gly	Pro	Gly	Tyr
225	230	235	Val
Leu	Pro	Leu	Asp
Gly	Asn	Ala	Ala
245	250	255	Val
Ile	His	Phe	Phe
Phe	Lys	Gly	Lys
260	265	270	Val
Trp	Arg	Tyr	Ile
Arg	Tyr	Ile	Asn
275	280	285	Phe
Met	Ser	Pro	Gly
Pro	Phe	Pro	Phe
Lys	Lys	Leu	Asn
290	295	300	Arg
Asp	Ala	Ala	Leu
Tyr	Tyr	Trp	Tyr
Trp	Pro	Leu	Asn
Asn	Gln	Lys	Val
305	310	315	Phe
Gly	Ser	Gly	Tyr
Tyr	Trp	Gln	Trp
325	330	335	Asp
Ser	Tyr	Pro	Lys
Pro	Ile	Lys	Gly
Ile	Lys	Gly	Leu
Phe	Thr	Gly	Val
340	345	350	Pro
Gly	Lys	Val	Asn
355	360	365	Gln
Tyr	Arg	Asn	Ile
370	375	380	Ser
Ile	Asp	Thr	His
385	390	395	Asn
Thr	Pro	Ser	Trp
Gly	Gly	Gly	Asn
395	400	405	Thr
Arg	Asn	Thr	Trp
410	415	410	Met
His	Asn	His	Cys
415	420	425	Arg
Trp	Trp	Arg	Pro
Asn	Asn	Asn	Arg
425	430	435	Thr
435	440	445	Thr
445	450	455	Pro
455	460	465	Ser
465	470	475	Gly
475	480	485	Thr
485	490	495	Pro
495	500	505	Ser
505	510	515	Gly
515	520	525	Thr
525	530	535	Gly
535	540	545	Val
545	550	555	Glu
555	560	565	Lys
565	570	575	Gly
575	580	585	Asn
585	590	595	Gly
595	600	605	Leu
605	610	615	Leu
615	620	625	Gly
625	630	635	His
635	640	645	Trp
645	650	655	Arg
655	660	665	Arg
665	670	675	Ile

【0088】

【配列番号：5】

配列の長さ：419

配列

Tyr Leu Leu Leu Gly His Trp Arg L50 Lys His Leu Thr Phe Glu Tyr

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

57

58

1	5	10	15
Leu Asn Val Pro Ser Thr Leu Ser Pro Ser Arg Val Arg Ala Ala Leu			
20	25	30	
His Gln Ala Phe Lys Tyr Trp Ser Asn Val Ala Pro Leu Thr Phe Arg			
35	40	45	
Glu Val Lys Ala Gly Trp Ala Asp Ile Arg Leu Ser Phe His Gly Arg			
50	55	60	
Gln Ser Pro Tyr Cys Ser Asn Ser Phe Asp Gly Pro Gly Lys Val Leu			
65	70	75	80
Ala His Ala Asp Val Pro Glu Leu Gly Ser Val His Phe Asp Asn Asp			
85	90	95	
Glu Phe Trp Thr Glu Gly Thr Tyr Gln Gly Val Asn Leu Arg Ile Ile			
100	105	110	
Ala Ala His Glu Val Gly His Ala Leu Gly Leu Gly His Ser Arg Tyr			
115	120	125	
Thr Gln Ala Leu Met Ala Pro Val Tyr Ala Gly Tyr Gln Pro Tyr Phe			
130	135	140	
Arg Leu His Pro Asp Asp Val Ala Gly Ile Gln Ala Leu Tyr Gly Lys			
145	150	155	160
Arg Arg Pro Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Val Glu Met His Thr			
165	170	175	
Val Ser Thr Val Thr Thr Lys Pro Ser Pro Met Pro Asn Pro Cys Ser			
180	185	190	
Ser Glu Val Asp Ala Met Met Leu Gly Pro Arg Gly Lys Thr Tyr Ala			
195	200	205	
Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Thr Asp Ser Gly Pro Gly Pro			
210	215	220	
Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu Pro Gly Asn Leu Asp			
225	230	235	240
Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Arg Thr His Phe Phe Lys Gly			
245	250	255	
Asn Lys Val Trp Arg Tyr Val Asp Phe Lys Leu Ser Pro Gly Phe Pro			
260	265	270	
Met Lys Leu Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu Asp Ala Ala Leu Tyr Trp			
275	280	285	
Pro Val Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly Ser Gly Tyr Trp Gln			
290	295	300	
Trp Asp Glu Leu Thr Arg Thr Asp Leu Ser Arg Tyr Pro Lys Pro Ile			
305	310	315	320
Lys Glu Leu Phe Thr Gly Val Pro Asp Gln Pro Ser Ala Ala Met Ser			
325	330	335	
Trp Gln Asp Gly Gln Val Tyr Phe Phe Lys Gly Lys Glu Tyr Trp Arg			
340	345	350	
Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val Ala Lys Gly Tyr Pro Arg Asn Thr Thr			
355	360	365	
His Trp Met His Cys Ser Pro Arg Thr Pro Asp Thr Asn Ser Leu Thr			
370	375	380	
Gly Asp Val Thr Thr Pro Ala Thr Val Glu Ser Val Leu Asp Val Pro			
385	390	395	400
Ser Ala Thr Asp Ala Ala Ser Leu S50 Ser Ser Ala Asn Val Thr Leu			

59

405

410

60

415

Leu Gly Ala

【0089】

【配列番号：6】

配列の長さ：424

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Gln	Lys	Thr	Leu	Lys	Tyr	Leu	Leu	Leu
Gly	His	Trp	Arg	Lys	Lys	His		
1				5				
					15			
Leu	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Asn	Val	Pro
Ser	Thr	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg		
				20			25	
					30			
Val	Arg	Ala	Ala	Leu	His	Gln	Ala	Phe
Lys	Tyr	Trp	Ser	Asn	Val	Ala		
			35				40	
					45			
Pro	Leu	Thr	Phe	Arg	Gl u	Val	Lys	Ala
Gly	Trp	Ala	Asp	Ile	Arg	Leu		
			50			55		
					60			
Ser	Phe	His	Gly	Arg	Gln	Ser	Pro	Tyr
Cys	Ser	Asn	Ser	Phe	Asp	Gly		
			65			70		
					75		80	
Pro	Gly	Lys	Val	Leu	Ala	His	Ala	Asp
Val	Pro	Gl u	Leu	Gly	Ser	Val		
				85				
			90			95		
His	Phe	Asp	Asn	Asp	Gl u	Phe	Trp	Thr
Gl u	Gly	Thr	Tyr	Gln	Gly	Val		
				100			105	
					110			
Asn	Leu	Arg	Ile	Ile	Ala	Ala	His	Gl u
Val	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Leu		
				115			120	
					125			
Gly	His	Ser	Arg	Tyr	Thr	Gln	Ala	Leu
Met	Ala	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly		
			130			135		
					140			
Tyr	Gln	Pro	Tyr	Phe	Arg	Leu	His	Pro
Asp	Asp	Val	Ala	Gly	Ile	Gln		
			145			150		
					155		160	
Ala	Leu	Tyr	Gly	Lys	Arg	Arg	Pro	Gl u
Pro	Gl u	Asp	Gl u	Gl u	Gl u	Gl u		
				165				
			170		50	175		

(32)

特開平10-80283

61

62

Val	Glu	Met	His	Thr	Val	Ser	Thr	Val
Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Pro	Met		
				180				185
					190			
Pro	Asn	Pro	Cys	Ser	Ser	Glu	Val	Asp
Ala	Met	Met	Leu	Gly	Pro	Arg		
				195				200
					205			
Gly	Lys	Thr	Tyr	Ala	Phe	Lys	Gly	Asp
Tyr	Val	Trp	Thr	Val	Thr	Asp		
	210					215		
					220			
Ser	Gly	Pro	Gly	Pro	Leu	Phe	Arg	Val
Ser	Ala	Leu	Trp	Glu	Gly	Leu		
	225				230			
					235			240
Pro	Gly	Asn	Leu	Asp	Ala	Ala	Val	Tyr
Ser	Pro	Arg	Thr	Gln	Arg	Thr		
	245							
		250				255		
His	Phe	Phe	Lys	Gly	Asn	Lys	Val	Trp
Arg	Tyr	Val	Asp	Phe	Lys	Leu		
		260					265	
				270				
Ser	Pro	Gly	Phe	Pro	Met	Lys	Leu	Asn
Arg	Val	Glu	Pro	Asn	Leu	Asp		
	275					280		
			285					
Ala	Ala	Leu	Tyr	Trp	Pro	Val	Asn	Gln
Lys	Val	Phe	Leu	Phe	Lys	Gly		
	290					295		
			300					
Ser	Gly	Tyr	Trp	Gln	Trp	Asp	Glu	Leu
Thr	Arg	Thr	Asp	Leu	Ser	Arg		
	305				310			
		315				320		
Tyr	Pro	Lys	Pro	Ile	Lys	Glu	Leu	Phe
Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Gln	Pro		
		325						
			330			335		
Ser	Ala	Ala	Met	Ser	Trp	Gln	Asp	Gly
Gln	Val	Tyr	Phe	Phe	Lys	Gly		
		340					345	
			350					
Lys	Glu	Tyr	Trp	Arg	Leu	Asn	Gln	Gln
Leu	Arg	Val	Ala	Lys	Gly	Tyr		
	355					360		
			365					
Pro	Arg	Asn	Thr	Thr	His	Trp	Met	His
Cys	Ser	Pro	Arg	T501r	Pro	Asp		

63

370

380

Thr Asn Ser Leu Thr Gly Asp Val Thr

Thr Pro Ala Thr Val Glu Ser

385

390

395

400

Val Leu Asp Val Pro Ser Ala Thr Asp

Ala Ala Ser Leu Ser Ser Ser

405

410

415

Ala Asn Val Thr Leu Leu Gly Ala

420

【0090】

【配列番号：7】

配列の長さ：1524

配列の型：核酸

*鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

*

配列

ATGAAC TGCC AGCAGCTGTG GCTGGGCTTC CTA
 CTCCCCA TGACAGTCTC AGGCCGGGTC 60
 CTGGGGCTTG CAGAGGTGGC GCCCGTGGAC TAC
 CTGTCAC AATATGGGT A CCTACAGAAAG 120
 CCTCTAGAAC GATCTAATAA CTTCAAGCCA GAA
 GATATCA CCGAGGCTCT GAGAGCTTT 180
 CAGGAAGCAT CTGAAC TTCC AGTCTCAGGT CAG
 CTGGATG ATGCCACAAG GGCCCGCATG 240
 AGGCAGCCTC GTTGTGGCCT AGAGGATCCC TTC
 AACCAAGA AGACCCTTAA ATACCTGTTG 300
 CTGGGCCGCT GGAGAAAGAA GCACCTGACT TTC
 CGCATCT TGAACCTGCC CTCCACCCCTT 360
 CCACCCCCACA CAGCCCAGGC AGCCCTGCGT CAA
 GCCTTCC AGGACTGGAG CAATGTGGCT 420
 CCCTTGACCT TCCAAGAGGT GCAGGCTGGT GCG
 GCTGACA TCCGCCTCTC CTTCCATGGC 480
 CGCCAAAGCT CGTACTGTTC CAATACTTTT GAT
 GGGCCTG GGAGAGTTCT GGCCCATGCC 540
 GACATCCCAG AGCTGGGCAG TGTGCACCTTC GAC
 GAAGACG AGTTCTGGAC TGAGGGGACC 600
 TACCGTGGGG TGAACCTGCG CATCATTGCA GCC
 CATGAAG TGGGCCATGC TCTGGGGCTT 660
 GGGCACTCCC GATATTCCA GCCCCTCATG GCC
 CCAGTCT ACGAGGGCTA CCGGCCAC 720
 TTTAAGCTGC ACCCAGATGA TGTGGCAGGG ATC
 CAGGCTC TCTATGGCAA GAAGAGTCCA 780
 GTGATAAGGG ATGAGGAAGA AGAAGAGACA GAG
 CTGCCCA CTGTGCCCTC AGTGCCCACA 840
 GAACCCAGTC CCATGCCAGA CCCTTGCAGT AGT
 GAACTGG ATGCCATGAT GCTGGGGCCC 900
 CGTGGGAAGA CCTATGCTTT CAAGGGGGAC TAT
 GTGTGGGA CTGTATCAGA TTCAGGACCG 960
 GGCCCTTGT TCCGAC50GTGTC TGCCCTTTGG GAG

65

66

GGGCTCC CGGGAAACCT GGATGCTGCT 1020
 GTCTACTCGC CTCGAACACA ATGGATTACAC TTCA
 TTTAAGG GAGACAAGGT GTGGCGCTAC 1080
 ATTAATTCA AGATGTCCTCC TGGCTTCCCC AAG
 AAGCTGA ATAGGGTAGA ACCTAACCTG 1140
 GATGCAGCTC TCTATTGCC TCTCAACCAA AAG
 GTGTTCC TCTTTAAGGG CTCCGGGTAC 1200
 TGGCAGTGGG ACGAGCTAGC CCGAACTGAC TTC
 AGCAGCT ACCCCAAACC AATCAAGGGT 1260
 TTGTTTACGG GAGTGCCAAA CCAGCCCTCG GCT
 GCTATGA GTTGGCAAGA TGGCCGAGTC 1320
 TACTTCTTCA AGGGCAAAGT CTACTGGCGC CTC
 AACCAAGC AGCTTCGAGT AGAGAAAGGC 1380
 TATCCCAGAA ATATTTCCA CAACTGGATG CAC
 TGTCGTC CCCGGACTAT AGACACTACC 1440
 CCATCAGGTG GGAATACCAC TCCCTCAGGT ACG
 GGCATAA CCTTGGATAC CACTCTCTCA 1500
 GCCACAGAAA CCACGTTGA ATAC

1524

【0091】

【配列番号：8】

配列の長さ：1551

配列の型：核酸

*鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

*

配列

ATGGACTGGC AGCAGCTGTG GCTGGCCTTC TTACTTCCTG TGACAGTCTC AGGCCGGGCT 60
 CTGGGGCTG CAGAGAAGGA GGCGGTGGT GATTACCTGT TGCAGTATGG GTATCTACAG 120
 AAACCTCTGG AAGGAGCTGA TGACTTCAGG CTAGAAGATA TCACAGAGGC TCTAAGAACT 180
 TTCCAGGAAG CATCTGAACCT GCCTGTTCC GGTCAGATGG ATGATGCCAC AAGGGCCCGT 240
 ATGAAGCAGC CCCGTTGTGG CCTGGAGGAT CCTTTCAACC AGAAGACTCT GAAATACCTG 300
 CTTCTGGGCC ACTGGAGAAA GAAGCACTTG ACATTCCGCA TCTTGAACGT GCCCTCCACC 360
 CTCTCACCCCT CCAGAGTCCG AGCAGCCCTG CATCAAGCCT TTAAGTATTG GAGCAATGTA 420
 GCCCCCCCTGA CCTTCCGGGA GGTGAAAGCT GGTTGGGCTG ATATCCGCCT CTCGTTCCAT 480
 GGCCGCCAAA GCCCATACTG CTCCAACAGC TTTGATGGC CTGGGAAGGT CCTGGCCCAT 540
 GCTGACGTCC CAGAGCTTGG CAGTGTACAC TTGATAACG ATGAATTCTG GACCGAGGGC 600
 ACCTACCAGG GAGTGAACCT ACGCATCATT GCGGCCCATG AGGTGGGCCA CGCCCTGGGA 660
 CTTGGGCATT CCCGATATAC CCAGGCACTC ATGGCGCTG TTTACGCTGG CTACCAGCCC 720
 TACTTCAGGC TGCATCCGGA TGATGTGGCA GGGATCCAGG CGCTCTATGG CAAGAGGAGG 780
 CCGGAGCCAG AAGATGAGGA GGAAGAGGTG GAGATGCACA CTGTGTCAAC AGTGACCACA 840
 AAACCCAGTC CCATGCCAAA CCCCTGCAGC AGTGAAGTGG ATGCCATGAT GCTAGGGCCT 900
 CGGGGGAAAGA CCTATGCTTT CAAGGGTGAC TATGTGTGGA CTGTAACAGA TTCAGGGCCA 960
 GGGCCCTTGT TCCGAGTGTC TGCCCTTGG GAGGGGCTTC CTGGAAACCT GGATGCTGCT 1020
 GTCTACTCTC CCCGGACACA GCGGACTCAT TTCTTCAAGG GAAACAAGGT GTGGCGGTAT 1080
 GTGGATTTCAGTCTCC TGGCTTCCC ATGAAACTCA ACAGAGTGG ACCAACCTA 1140
 GATGCAGCTC TCTATTGCC TGTTAATCAG AAGGTGTCC TTTTAAGGG CTCAGGATAC 1200
 TGGCAATGGG ATGAACTGAC CAGAACTGAC CTCAGTCGCT ACCCCAAACC AATCAAGGAA 1260
 CTTTTCACTG GAGTGCCAGA CCAACCCCTCA GCAGCTATGA GCTGGCAAGA TGGCCAAGTC 1320
 TACTTCTTCA AGGGCAAAGA GTACTGGCGC CTTAACCAAGC AACTTCGAGT GGCAAAGGGC 1380
 TATCCCAGAA ATACGACACA CTGGATGCAC TGTAGTCCTC GGACTCCAGA CACTAACTCA 1440
 TTAACTGGGG ATGTGACCAC TCCTGCAACC GTGGAATCAG TCTGGATGT TCCCTCTGCC 1500
 ACAGACGCTG CCTCCCTCTC ATCCTCAGCT .50TGTACCT TGCTAGGGC C 1551

【0092】

【配列番号：9】

配列の長さ：1233

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA
 *

配列

TACCTGTTGC	TGGGCCGCTG	GAGAAAGAAG	CACCTGACTT	TCCGCATCTT	GAACCTGCC	60
TCCACCCCTTC	CACCCCACAC	AGCCCGGGCA	GCCCTGCGTC	AAGCCTTCCA	GGACTGGAGC	120
AATGTGGCTC	CCTTGACCTT	CCAAGAGGTG	CAGGCTGGTG	CGGCTGACAT	CCGCCTCTCC	180
TTCCATGGCC	GCCAAAGCTC	GTACTGTTCC	AATACTTTG	ATGGGCCTGG	GAGAGTTCTG	240
GCCCATGCCG	ACATCCCAGA	GCTGGGCAGT	GTGCACCTCG	ACGAAGACGA	GTTCTGGACT	300
GAGGGGACCT	ACCGTGGGGT	GAACCTGCGC	ATCATTGCAG	CCCATGAAGT	GGGCATGCT	360
CTGGGGCTTG	GGCACTCCCG	ATATTCCAG	GCCCTCATGG	CCCCAGTCTA	CGAGGGCTAC	420
CGGGCCCAC	TTAAGCTGCA	CCCAGATGAT	GTGGCAGGG	TCCAGGCTCT	CTATGGCAAG	480
AAGAGTCCAG	TGATAAGGG	TGAGGAAGAA	GAAGAGACAG	AGCTGCCAC	TGTGCC	540
GTGCCACAG	AACCCAGTCC	CATGCCAGAC	CCTTGCAGTA	GTGAAC	TGCCATGATG	600
CTGGGGCCCC	GTGGGAAGAC	CTATGTTTC	AAGGGGACT	ATGTGTGGAC	TGTATCAGAT	660
TCAGGACCGG	GCCCCTTGTT	CCGAGTGTCT	GCCCTTG	AGGGGCTCCC	CGGAAACCTG	720
GATGCTGCTG	TCTACTCGCC	TCGAACACAA	TGGATTCACT	TCTTAAGGG	AGACAAGGTG	780
TGGCGCTACA	TTAATTCAA	GATGTCTCCT	GGCTTCCCCA	AGAAGCTGAA	TAGGGTAGAA	840
CCTAACCTGG	ATGCAGCTCT	CTATTGGCCT	CTCAACCAAA	AGGTGTTCC	CTTTAAGGGC	900
TCCGGGTACT	GGCAGTGGGA	CGAGCTAGCC	CGAACTGACT	TCAGCAGCTA	CCCCAAACCA	960
ATCAAGGGTT	TGTTTACGGG	AGTGCCAAC	CAGCCCTCGG	CTGCTATGAG	TTGGCAAGAT	1020
GGCCGAGTCT	ACTTCTCAA	GGGCAAAGTC	TACTGGCGCC	TCAACCAGCA	GCTTCGAGTA	1080
GAGAAAGGCT	ATCCCAGAAA	TATTTCCCAC	AACTGGATGC	ACTGTCGTCC	CCGGACTATA	1140
GACACTACCC	CATCAGGTGG	GAATACCACT	CCCTCAGGTA	CGGGCATAAC	CTTGGATACC	1200
ACTCTCTCAG	CCACAGAAAC	CACGTTGAA	TAC			1233

【0093】

【配列番号：10】

配列の長さ：1248

配列の型：核酸

※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

※30

配列

CAGAAGACCC	TTAAATACCT	GTTGCTGGC	CGCTGGAGAA	AGAAGCACCT	GACTTTCCGC	60
ATCTTGAACC	TGCCCTCCAC	CCTTCCACCC	CACACAGCCC	GGGCAGCCCT	GCGTCAAGCC	120
TTCCAGGACT	GGAGCAATGT	GGCTCCCTTG	ACCTTCCAAG	AGGTGCAGGC	TGGTGCAGGCT	180
GACATCCGCC	TCTCCTTCCA	TGGCCGCCAA	AGCTCGACT	GTTCCAATAC	TTTGATGGG	240
CCTGGGAGAG	TTCTGGCCCA	TGCCGACATC	CCAGAGCTGG	GCAGTGTGCA	CTTCGACGAA	300
GACGAGTTCT	GGACTGAGGG	GACCTACCGT	GGGGTGAACC	TGCGCATCAT	TGCAGCCCAT	360
GAAGTGGGCC	ATGCTCTGGG	GCTTGGCAC	TCCCGATATT	CCCAGGCC	CATGGCCCCA	420
GTCTACGAGG	GCTACCGGCC	CCACTTAAAG	CTGCACCCAG	ATGATGTGGC	AGGGATCCAG	480
GCTCTCTATG	GCAAGAAGAG	TCCAGTGATA	AGGGATGAGG	AAGAAGAAGA	GACAGAGCTG	540
CCCACGTGTC	CCCCAGTGCC	CACAGAACCC	AGTCCCATGC	CAGACCCTTG	CAGTAGTGAA	600
CTGGATGCCA	TGATGCTGGG	GCCCCGTGGG	AAGACCTATG	CTTTCAAGGG	GGACTATGTG	660
TGGACTGTAT	CAGATTCAAGG	ACCGGGCCCC	TTGTTCCGAG	TGTCTGCC	TTGGGAGGG	720
CTCCCCGGAA	ACCTGGATGC	TGCTGTCTAC	TCGCCTCGAA	CACAATGGAT	TCACTTCTT	780
AAGGGAGACA	AGGTGTGGCG	CTACATTAAT	TTCAAGATGT	CTCCTGGCTT	CCCCAAGAAG	840
CTGAATAGGG	TAGAACCTAA	CCTGGATGCA	GCTCTCTATT	GGCCTCTCAA	CCAAAAGGTG	900
TTCCTCTTA	AGGGCTCCGG	GTACTGGCAG	TGGGACGAGC	TAGCCCGAAC	TGACTTCAGC	960
AGCTACCCCA	AACCAATCAA	GGGTTGTTT	ACGGGAGTGC	CAAACCAGCC	CTCGGCTGCT	1020
ATGAGTTGGC	AAGATGGCCG	AGTCTACTTC	TTCAAGGGCA	AACTACTG	GCGCCTAAC	1080
CAGCAGCTTC	GAGTAGAGAA	AGGCTATCCC	.50AAATATT	CCCACAACTG	GATGCACTGT	1140

69

70

CGTCCCCGGA CTATAGACAC TACCCCATCA GGTGGGAATA CCACTCCCTC AGGTACGGGC 1200
 ATAACCTTGG ATACCACTCT CTCAGCCACA GAAACCACGT TTGAATAC 1248

【0094】

【配列番号：11】

配列の長さ：1257

配列の型：核酸

*鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

*

配列

TACCTGCTTC TGGGCCACTG GAGAAAGAAG CACTTGACAT TCCGCATCTT GAACGTGCC 60
 TCCACCCTCT CACCCCTCCAG AGTCCGAGCA GCCCTGCATC AAGCCTTTAA GTATTGGAGC 120
 AATGTAGCCC CCCTGACCTT CCGGGAGGTG AAAGCTGGTT GGGCTGATAT CCGCCTCTCG 180
 TTCCATGGCC GCCAAAGCCC ATACTGCTCC AACAGCTTG ATGGGCCTGG GAAGGTCCTG 240
 GCCCATGCTG ACGTCCCAGA GCTTGGCAGT GTACACTTCG ATAACGATGA ATTCTGGACC 300
 GAGGGCACCT ACCAGGGAGT GAACCTACGC ATCATTGCGG CCCATGAGGT GGGCCACGCC 360
 CTGGGACTTG GGCATTCCCC ATATACCCAG GCACTCATGG CGCCTGTTA CGCTGGCTAC 420
 CAGCCCTACT TCAGGCTGCA TCCGGATGAT GTGGCAGGGA TCCAGGCGCT CTATGGCAAG 480
 AGGAGGCCGG AGCCAGAAGA TGAGGAGGAA GAGGTGGAGA TGCACACTGT GTCAACAGTG 540
 ACCACAAAAC CCAGTCCCCT GCCAAACCCC TGCAAGCAGT AAGTGGATGC CATGATGCTA 600
 GGGCCTCGGG GGAAGACCTA TGCTTCAAG GGTGACTATG TGTGGACTGT AACAGATTCA 660
 GGGCCAGGGC CCTTGTTCG AGTGTCTGCC CTTTGGGAGG GGCTTCCTGG AAACCTGGAT 720
 GCTGCTGTCT ACTCTCCCCG GACACAGCGG ACTCATTCT TCAAGGGAAA CAAGGTGTGG 780
 CGGTATGTGG ATTTCAAGTT GTCTCCTGGC TTTCCATGA AACTCAACAG AGTGGAACCC 840
 AACCTAGATG CAGCTCTCTA TTGGCCTGTT AATCAGAAGG TGTCCCTTT TAAGGGCTCA 900
 GGATACTGGC AATGGGATGA ACTGACCAAGA ACTGACCTCA GTCGCTACCC CAAACCAATC 960
 AAGGAACCTT TCACTGGAGT GCCAGACCAA CCCTCAGCAG CTATGAGCTG GCAAGATGGC 1020
 CAAGTCTACT TCTTCAAGGG CAAAGAGTAC TGGCGCCTTA ACCAGCAACT TCGAGTGGCA 1080
 AAGGGCTATC CCAGAAATAC GACACACTGG ATGCACTGTA GTCCTCGGAC TCCAGACACT 1140
 AACTCATTAA CTGGGGATGT GACCACTCCT GCAACCGTGG AATCAGTCTT GGATGTTCCC 1200
 TCTGCCACAG ACGCTGCCCTC CCTCTCATCC TCAGCTAATG TCACCTTGCT AGGGGCC 1257

【0095】

*鎖の数：二本鎖

【配列番号：12】

30 トポロジー：直鎖状

配列の長さ：1272

配列の種類：cDNA

※

配列

CAGAAGACTC TGAAATACCT GCTTCTGGC CACTGGAGAA AGAAGCACTT GACATTCCGC 60
 ATCTTGAACG TGCCCTCCAC CCTCTCACCC TCCAGAGTCC GAGCAGCCCT GCATCAAGCC 120
 TTTAAGTATT GGAGCAATGT AGCCCCCTG ACCTTCCGGG AGGTGAAAGC TGGTTGGGCT 180
 GATATCCGCC TCTCGTCCA TGGCCGCCAA AGCCCATACT GCTCCAACAG CTTTGATGGG 240
 CCTGGGAAGG TCCTGGCCCA TGCTGACGTC CCAGAGCTG GCAGTGTACA CTTCGATAAAC 300
 GATGAATTCT GGACCGAGGG CACCTACCAG GGAGTGAACC TACGCATCAT TGCAGGCCAT 360
 GAGGTGGGCC ACGCCCTGGG ACTTGGGCAT TCCCGATATA CCCAGGCACT CATGGCGCCT 420
 GTTTACGCTG GCTACCAGCC CTACTTCAGG CTGCATCCGG ATGATGTGGC AGGGATCCAG 480
 GCGCTCTATG GCAAGAGGAG GCCGGAGCCA GAAGATGAGG AGGAAGAGGT GGAGATGCAC 540
 ACTGTGTCAA CAGTGACCAAC AAAACCCAGT CCCATGCCAA ACCCCTGCAG CAGTGAAGTG 600
 GATGCCATGA TGCTAGGGCC TCGGGGGAAAG ACCTATGCTT TCAAGGGTGA CTATGTGTGG 660
 ACTGTAACAG ATTCAAGGGCC AGGGCCCTTG TTCCGAGTGT CTGCCCTTTG GGAGGGCTT 720
 CCTGGAAACC TGGATGCTGC TGTCTACTCT CCCCAGACAC AGCGGACTCA TTTCTTCAAG 780
 GGAAACAAGG TGTGGCGGTA TGTGGATTTC AAGTTGTCTC CTGGCTTCC CATGAAACTC 840
 AACAGAGTGG AACCCAAACCT AGATGCAGCT CTCTATTGGC CTGTTAATCA GAAGGTGTT 900
 CTTTTAAGG GCTCAGGATA CTGGCAATGG GATGAACGTA CCAGAACTGA CCTCAGTCGC 960
 TACCCCAAAC CAATCAAGGA ACTTTCACT 50AGTGCCAG ACCAACCCCTC AGCAGCTATG 1020

71

AGCTGGCAAG ATGGCCAAGT CTACTTCTTC AAGGGCAAAG AGTACTGGCG CCTTAACCAG 1080
 CAACTTCGAG TGGCAAAGGG CTATCCCAGA AATACGACAC ACTGGATGCA CTGTAGTCCT 1140
 CGGACTCCAG ACACACTAAC TC ATTAACTGGG GATGTGACCA CTCCTGCAAC CGTGGAAATCA 1200
 GTCTTGGATG TTCCCTCTGC CACAGACGCT GCCTCCCTCT CATCCTCAGC TAATGTCACC 1260
 TTGCTAGGGG CC 1272

【0096】

【配列番号：13】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCTGACATCC GCCTCTCCTT 20

【0097】

【配列番号：14】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGGCCCGGTC CTGAAATCTG 0

【0098】

【配列番号：15】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCCGCATGCT ACCTGTTGCT GGG CCGCTG

【0099】

【配列番号：16】

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAGCTGCAGA TCTACGGTCT TGCGCCTGCT ACA

【0100】

【配列番号：17】

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

72

* 配列

GGCAGGGATC CAGGCTCTC

19

【0101】

10 【配列番号：18】

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TGCATCCAGG TTAGGTTTC

18

【0102】

20 【配列番号：19】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCCGGAGCCA GAAGATGAGG 20

【0103】

【図面の簡単な説明】

30 【図1】本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼのアミノ酸配列を示す。

【図2】本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。図1に示したアミノ酸配列のN末端から97個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列である。

【図3】本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。図1に示したアミノ酸配列のN末端から92個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列である。

40 【図4】本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼをコードするDNAを含むDNAの塩基配列を示す。

【図5】本発明のヒト肝臓由来メタロプロテアーゼと抗ヒト肝臓由来メタロプロテアーゼ抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった時の電気泳動写真を示す。横軸は各サンプル番号を示し、レーン1は分子量マーカーを、レーン2は非感染のHighFive細胞の培養上清を、レーン3はβ-ガラクトシダーゼ発現組換えウイルス（インビトロゲン社製）を感染させたHighFive細胞の培養上清を、レーン4はヒト肝臓由来メタロプロテアーゼ発現組換えウイルスを感染させたHigh

h Five 細胞の培養上清を示す。縦軸は泳動距離 (cm) を示す。

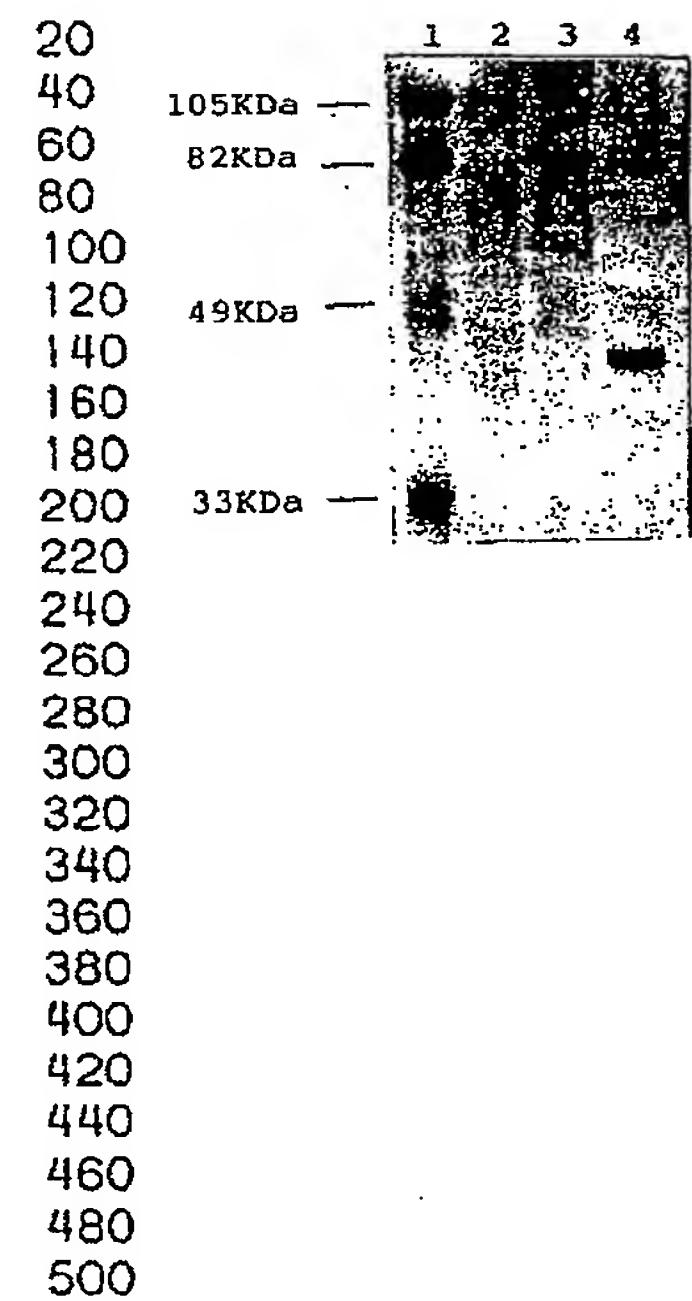
【図6】本発明のラット肝臓由来メタロプロテアーゼの*

* アミノ酸配列およびそれをコードするDNAを含むDNAの塩基配列を示す。

【図1】

Met Asn Cys Gln Gln Leu Trp Leu Gly Phe Leu Leu Pro Met Thr Val Ser Gly Arg Val
 Leu Gly Leu Ala Glu Val Ala Pro Val Asp Tyr Leu Ser Gln Tyr Gly Tyr Leu Gln Lys
 Pro Leu Glu Gly Ser Asn Asn Phe Lys Pro Glu Asp Ile Thr Glu Ala Leu Arg Ala Phe
 Gln Glu Ala Ser Glu Leu Pro Val Ser Gly Gln Leu Asp Asp Ala Thr Arg Ala Arg Met
 Arg Gln Pro Arg Cys Gly Leu Glu Asp Pro Phe Asn Gln Lys Thr Leu Lys Tyr Leu Leu
 Leu Gly Arg Trp Arg Lys Lys His Leu Thr Phe Arg Ile Leu Asn Leu Pro Ser Thr Leu
 Pro Pro His Thr Ala Arg Ala Leu Arg Gln Ala Phe Gln Asp Trp Ser Asn Val Ala
 Pro Leu Thr Phe Gln Glu Val Gln Ala Gly Ala Asp Ile Arg Leu Ser Phe His Gly
 Arg Gln Ser Ser Tyr Cys Ser Asn Thr Phe Asp Gly Pro Gly Arg Val Leu Ala His Ala
 Asp Ile Pro Glu Leu Gly Ser Val His Phe Asp Glu Asp Glu Phe Trp Thr Glu Gly Thr
 Tyr Arg Gly Val Asn Leu Arg Ile Ala Ala His Glu Val Gly His Ala Leu Gly Leu
 Gly His Ser Arg Tyr Ser Gln Ala Leu Met Ala Pro Val Tyr Glu Gly Tyr Arg Pro His
 Phe Lys Leu His Pro Asp Asp Val Ala Gly Ile Gln Ala Leu Tyr Gly Lys Ser Pro
 Val Ile Arg Asp Glu Glu Glu Thr Glu Leu Pro Thr Val Pro Pro Val Pro Thr
 Glu Pro Ser Pro Met Pro Asp Pro Cys Ser Ser Glu Leu Asp Ala Met Met Leu Gly Pro
 Arg Gly Lys Thr Tyr Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Ser Asp Ser Gly Pro
 Gly Pro Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu Pro Gly Asn Leu Asp Ala Ala
 Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Trp Ile His Phe Phe Lys Gly Asp Lys Val Trp Arg Tyr
 Ile Asn Phe Lys Met Ser Pro Gly Phe Pro Lys Leu Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu
 Asp Ala Ala Leu Tyr Trp Pro Leu Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly Ser Gly Tyr
 Trp Glu Trp Asp Glu Leu Ala Arg Thr Asp Ser Ser Tyr Pro Lys Pro Ile Lys Gly
 Leu Phe Thr Gly Val Pro Asn Gln Pro Ser Ala Ala Met Ser Trp Glu Asp Gly Arg Val
 Tyr Phe Phe Lys Gly Val Tyr Trp Arg Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val Glu Lys Gly
 Tyr Pro Arg Asn Ile Ser His Asn Trp Met His Cys Arg Pro Arg Thr Ile Asp Thr Thr
 Pro Ser Gly Gly Asn Thr Thr Pro Ser Gly Thr Gly Ile Thr Leu Asp Thr Thr Leu Ser
 Ala Thr Glu Thr Thr Phe Glu Tyr 508

【図5】



【図2】

Tyr Leu Leu Leu Gly Arg Trp Arg Lys Lys His Leu Thr Phe Arg Ile Leu Asn Leu Pro 20
 Ser Thr Leu Pro Pro His Thr Ala Arg Ala Ala Leu Arg Gln Ala Phe Gln Asp Trp Ser 40
 Asn Val Ala Pro Leu Thr Phe Gln Glu Val Gln Ala Gly Ala Ala Asp Ile Arg Leu Ser 60
 Phe His Gly Arg Gln Ser Ser Tyr Cys Ser Asn Thr Phe Asp Gly Pro Gly Arg Val Leu 80
 Ala His Ala Asp Ile Pro Glu Leu Gly Ser Val His Phe Asp Glu Asp Glu Phe Trp Thr 100
 Glu Gly Thr Tyr Arg Gly Val Asn Leu Arg Ile Ile Ala Ala His Glu Val Gly His Ala 120
 Leu Gly Leu Gly His Ser Arg Tyr Ser Gln Ala Leu Met Ala Pro Val Tyr Glu Gly Tyr 140
 Arg Pro His Phe Lys Leu His Pro Asp Asp Val Ala Gly Ile Gln Ala Leu Tyr Gly Lys 160
 Lys Ser Pro Val Ile Arg Asp Glu Glu Glu Glu Thr Glu Leu Pro Thr Val Pro Pro 180
 Val Pro Thr Glu Pro Ser Pro Met Pro Asp Pro Cys Ser Ser Glu Leu Asp Ala Met Met 200
 Leu Gly Pro Arg Gly Lys Thr Tyr Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val Trp Thr Val Ser Asp 220
 Ser Gly Pro Gly Pro Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly Leu Pro Gly Asn Leu 240
 Asp Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Trp Ile His Phe Phe Lys Gly Asp Lys Val 260
 Trp Arg Tyr Ile Asn Phe Lys Met Ser Pro Gly Phe Pro Lys Lys Leu Asn Arg Val Glu 280
 Pro Asn Leu Asp Ala Ala Leu Tyr Trp Pro Leu Asn Gln Lys Val Phe Leu Phe Lys Gly 300
 Ser Gly Tyr Trp Gln Trp Asp Glu Leu Ala Arg Thr Asp Phe Ser Ser Tyr Pro Lys Pro 320
 Ile Lys Gly Leu Phe Thr Gly Val Pro Asn Gln Pro Ser Ala Ala Met Ser Trp Gln Asp 340
 Gly Arg Val Tyr Phe Phe Lys Gly Lys Val Tyr Trp Arg Leu Asn Gln Gln Leu Arg Val 360
 Glu Lys Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Ser His Asn Trp Met His Cys Arg Pro Arg Thr Ile 380
 Asp Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Thr Pro Ser Gly Thr Gly Ile Thr Leu Asp Thr 400
 Thr Leu Ser Ala Thr Glu Thr Thr Phe Glu Tyr 411

【図3】

Gln Lys Thr Leu Lys Tyr Leu Leu Leu Gly Arg Trp Arg Lys Lys His Leu Thr Phe Arg	20
Ile Leu Asn Leu Pro Ser Thr Leu Pro Pro His Thr Ala Arg Ala Ala Leu Arg Gln Ala	40
Phe Gln Asp Trp Ser Asn Val Ala Pro Leu Thr Phe Gln Glu Val Gln Ala Gly Ala Ala	60
Asp Ile Arg Leu Ser Phe His Gly Arg Gln Ser Ser Tyr Cys Ser Asn Thr Phe Asp Gly	80
Pro Gly Arg Val Leu Ala His Ala Asp Ile Pro Glu Leu Gly Ser Val His Phe Asp Glu	100
Asp Glu Phe Trp Thr Glu Gly Thr Tyr Arg Gly Val Asn Leu Arg Ile Ile Ala Ala His	120
Glu Val Gly His Ala Leu Gly Leu Gly His Ser Arg Tyr Ser Gln Ala Leu Met Ala Pro	140
Val Tyr Glu Gly Tyr Arg Pro His Phe Lys Leu His Pro Asp Asp Val Ala Gly Ile Gln	160
Ala Leu Tyr Gly Lys Lys Ser Pro Val Ile Arg Asp Glu Glu Glu Glu Thr Glu Leu	180
Pro Thr Val Pro Pro Val Pro Thr Glu Pro Ser Pro Met Pro Asp Pro Cys Ser Ser Glu	200
Leu Asp Ala Met Met Leu Gly Pro Arg Gly Lys Thr Tyr Ala Phe Lys Gly Asp Tyr Val	220
Trp Thr Val Ser Asp Ser Gly Pro Gly Pro Leu Phe Arg Val Ser Ala Leu Trp Glu Gly	240
Leu Pro Gly Asn Leu Asp Ala Ala Val Tyr Ser Pro Arg Thr Gln Trp Ile His Phe Phe	260
Lys Gly Asp Lys Val Trp Arg Tyr Ile Asn Phe Lys Met Ser Pro Gly Phe Pro Lys Lys	280
Leu Asn Arg Val Glu Pro Asn Leu Asp Ala Ala Leu Tyr Trp Pro Leu Asn Gln Lys Val	300
Phe Leu Phe Lys Gly Ser Gly Tyr Trp Gln Trp Asp Glu Leu Ala Arg Thr Asp Phe Ser	320
Ser Tyr Pro Lys Pro Ile Lys Gly Leu Phe Thr Gly Val Pro Asn Gln Pro Ser Ala Ala	340
Met Ser Trp Gln Asp Gly Arg Val Tyr Phe Phe Lys Gly Lys Val Tyr Trp Arg Leu Asn	360
Gln Gln Leu Arg Val Glu Lys Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Ser His Asn Trp Met His Cys	380
Arg Pro Arg Thr Ile Asp Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Thr Pro Ser Gly Thr Gly	400
Ile Thr Leu Asp Thr Thr Leu Ser Ala Thr Glu Thr Thr Phe Glu Tyr	416

【図4】

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 AAGACCCCTCTGCCCTGGCTTGGCTCCCCAAGGCTCCCAGAAATCTCAAGTCAGGGACGGACACCCCTCTGGACCTCTCTCTGGCCACCATCGAAC
 M N
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TCCCACAGCTGTGGCTGGTTCCTACTCCCCATGACAGTCAGGCGGGCTCTGGGCTTCCAGAGGTGGGGCCCTGGACTACCTGTCACAATATC
 C Q Q L W L G F L L P H T V S G R V L G L A E V A P V D Y L S Q Y G
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GCTACCTACAGAACCCCTAGAACGATCTAAATAACTTCAGGCCAGAACGATATCACCGAGGGCTCTGAGAGCTTTCAAGGAAGCATCTGAACCTCCAGTC
 Y L Q K P L E G S N N F K P E D I T E A L R A F O E A S E L P V S
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 AGGTCAAGCTGGATGATGCCACAAGGGCCCGATGAGGCAGGCTCGTGTGGCTTAGAGGATCCCTCAACAGAACCCCTAAATACCTGTGCTGCC
 G Q L D O A T R A R M R Q P R C G L E D P F N Q K T L K Y L L L G
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CCTGGAGAAAGAACCCCTGACTTTCCCATCTTGAAACCTGCCCCTAACCCCTTAC
 R W R K K H L T F R I L N L P S T L P P H T A R A A L R Q A F Q D W
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 GGACCAATGPGCTCCCTGACCTTCCAAGAGGTCAGGCTGCTGCGGCTGACATCCGGCTCTCCATGCCCCAAGCTCTGACTCTCCAATAC
 S N Y A P L T F Q E V Q A G A A D I R L S F H G R O S S Y C S N T
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TTTCATGGCTGGGAGAGTCTGGCCCATCGACATCCAGAGCTGGCAGTGTGCACTTCGACCAAGGAGCTGACTGACCTGACGGGACCTACCGT
 F D G P G R V L A H A D I P E L G S V H F D E D E F W T E G T Y R
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 CGCGTCACCTGGCCATTCATGGAGCCCATGAAAGTGGCGGCGATGCTCGGCTTCCGATATTCCAGGCGCTCATGGCCCGAGCTCACAGG
 G V N L R I I A A H E V G H A L G L G H S R Y S Q A L M A P V Y E G
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GCTACGGCCCCACTTTAACGCTGACCCAGATGATGTOGGAGGGATCCAGGCTCTATGCCAAGAAGAGTCAGTGTAAAGGATGACGGAGAACAGA
 Y R P H F K L H P D D V A G I Q A L Y G K K S P V I R D E E E E
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 GACAGAGCTGCCACTGCCCCACTGCCCCACAGAACCCAGTCCATGCCAGACCTTCAGTACTGAACTGATGCCATGATEGCTGGGCCCCGG
 T E L P T V P P V P T E P S P M P D P C S S E L D A M M L G P R G
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 AAGACCTATGCTTCAAGGGGACTATGTTGGACTGTATCAAGTCAGGACGGGGCCCTTGTTCCTGACTGTCTCCCCCTTGGGAGGGGCTCCCCGGAA
 K T Y A F K G D Y V W T V S D S G P G P L F R V S A L W E G L P G N
 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ACCTGGATGCTGCTACTGGCTCGAACACATGGATTACITCTTAAAGGAGAACGGTGTGGCOCTACATTAATTCAAGATGTCCTGGCT
 L D A A V Y S P R T Q W I H F F K G D K V W R Y I N F K M S P G F
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 CCTCAAGAAGCTGAAATAGGGTAGAACCTAACCTGGATGCCAGTCCTATGGCTCTCAACCAAAGGTGTGGCTACTGGCAG
 P K X L N R V E P N L D A A L Y W P L N Q K V F L F K G S G Y W Q
 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TGCGACGGACTAGCCCCACTGACTTCAGCACTAACCCAAACCAATCACCGTTGTACCGGAGTCCAAACCCCGCTCGCTATGAGTGGC
 W D E L A R T D F S S Y P K P I K G L F T G V P N Q P S A A M S W Q
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AACATGGCCGAGCTACTTCTAACGCCAAAGTCTACTGGGGCTAACGCCAGCTTCAGTAGAGAACGCTATCCAGAAATATTCACCAACTG
 D G R V Y F F K G K V Y W R L N Q O L R V E K G Y P R N I S H N W
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 GATCCACTGTCGCCCCGGACTATAGACactAACCCATCAGGTCGGAAATACCACTCCCTACGTACGGGCTAACCTGGATACCACCTCTCACCA
 M H C R P R T I D T T P S G G N T T P S G T G I T L D T T L S A T
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 GAAACCACTTGAATACTGACTGCTACCCACAGACACAATCTGGACATTAACCCCTGAGGCTCCACCAACCCCTTCAATTCCCCCCCCAGANCC
 E T T F E Y *
 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TAAGGCTTAATAGCTGAATGAAATACCTGTCAGTAGAAACCTTGCAGGTGCTGAGAACGGCGCAAGACGGTAGATTTCAAGCTTTAACACTTC
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 ACTCCAGCCACCACTTCCCTGCTCCATTTCACCTCCCTGAGAAGCTCTCCCTAACATCACAGATCCCTAACCTAGATTGGCCCGAACCTCCATTCTCT
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 GTCTTAGACAGCCCTCCAACTCTGCTCTCTCTGAGGCTAACATGGCTGGAGGGAGATCCCTCCCTGCTGTTCTACATAAAATGCCAACAAAC
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 ACCATGGCCAGTAAACTGACCAAGGGCTTGGAAATCTTGAGAACATCAATTATGCTTATGATTACGGGCAAGCTATTAAACCTTGTGAATCTCAGA
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TTCCCCCATTTGCAACATTAGGTTAACGACCAACTGAGGATGTTGCACTAAATGAAATACTGTAIGTGAAGTCCCTGGCACAGTGTCTGCTACATTG
 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270

【図6】

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GTCCCCCTGGCTAGCCCTGTCCTCCAAGTCCCAGAAGTCTCAGGTCAAGGCTCAGGGCTCAGGCAGCTCTCGAACCTTGCTGGACATGGACTGGCA
 MetAspTrpGln
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GCAGCTGGCTGGCTCTTACTTCTGTGACAGTCTCAGGCCGGCTCTGGGGCTCGAGAGAAGGAGGGTGGATTACCTGTTGCAGTATGCC
 GlnLeuTrpLeuAlaPheLeuLeuProValThrValSerGlyArgAlaLeuGlyProAlaGluLysGluAlaValValAspTyrLeuLeuGlnTyrGly
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TATCTACAGAAACCTCTGGAAGGAGCTGACTTCAGGCTAGAAGATATCACAGAGGCTCTAAGAACCTTCCAGGAAGCATCTGAACCTGCCCTGGTTCGG
 TyrLeuGlnLysProLeuGluGlyAlaAspAspPheArgLeuGluAspIleThrGluAlaLeuArgThrPheGlnGluAlaSerGluLeuProValSerGly
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GTACATGGATGATGCCACAAGGGCCCGTATGAAGCAGCCCGTGTGGCCCTGGAGGATCTTCAACCAGAAAGACTCTGAAATACCTGCCCTCTGGCCA
 GlnMetAspAspAlaThrArgAlaArgMetLysGlnProArgCysGlyLeuGluAspProPheAsnGlnLysThrLeuLysTyrLeuLeuLeuGlyHis
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CTCGAGAAAGAACCACTTGACATTCCGCATCTTGACGTCGCCCTCCACCCCTCTCAGACTCGGAGCAGCCCTGCACTCAAGCTTTAAGTATTGG
 TrpArgLysHisLeuThrPheArgIleLeuAsnValProSerThrLeuSerProSerArgValArgAlaAlaLeuHisGlnAlaPheLysTyrTrp
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AGCAATGTAGCCCCCTGACCTTCCGGAGGTGAAAGCTGGTTGGCTGATATCCGCCTCTCGTCCATGCCGCCAAAGCCCATACTGCTCCAACAGCT
 SerAsnValAlaProLeuThrPheArgGluValLysAlaGlyTrpAlaAspIleArgLeuSerPheHisGlyArgGlnSerProTyrCysSerAsnSerPhe
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TTGATGGGCTGGGAAGGCTCTGGCCCATGCTGACCTCCAGAGCTTGGCAGTGTACACTTCGATAACGATGAATTCTGGACCAGGGCACCTACCAGGG
 AspGlyProGlyLysValLeuAlaHisAlaAspValProGluLeuGlySerValHisPheAspAsnAspGluPheTrpThrGluGlyThrTyrGlnGly
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 AGTGAACTACGGCATCATGGGGCCATGAGCTGGCCACGCCCTGGGACTTGGGATTCGGGATTCGGGATATACCCAGGGACTCATGGGCCCTGTTACCGCTGGC
 ValAsnLeuArgIleIleAlaAlaHisGluValGlyHisAlaLeuGlyLeuGlyHisSerArgTyrThrGlnAlaLeuMetAlaProValTyrAlaGly
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 TACCAAGCCCTACTTCAGGCTGACATCCGGATGATGTGCGAGGGATCCAGGGCTCTATGGCAAGGAGGAGCCGGAGCAGAAGATGAGGAGGAAGAGGTGG
 TyrGinProTyrPheArgLeuHisProAspAspValAlaGlyIleGlnAlaLeuTyrGlyLysArgArgProGluProGluGluGluValGlu
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 AGATCCACACTGTGCAACAGTGAACCAAAAACCCACTCCCCTGCCAAACCCCTGCAACGACTGAGTGGATGCCATGCTAGGGCTCGGGAAAGAC
 MetHisThrValSerThrValThrThrLysProSerProMetProAsnProCysSerSerGluValAspAlaMetMetLeuGlyProArgGlyLysThr
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CTATGCTTTCAAGGGTGACTATGTTGACTGTAACAGATTGAGCTGGGGCCAGGGCTITGGTCTGCCCCCTTGGGAGGGCTTCTGGAAACCTG
 TyrAlaPheLysGlyAspTyrValTrpThrValThrAspSerGlyProGlyProLeuPheArgValSerAlaLeuTrpGluGlyLeuProGlyAsnLeu
 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GATGCTGCTGCTACTCTCCCGGACACAGCGGACTCTTCAAGGAAACAAGGTGTTGGCCCTATGCGATTTCAGGTTCTCTGGCTTCTCCA
 AspAlaAlaValTyrSerProArgThrGlnArgThrHisPhePheLysGlyAsnLysValTrpArgTyrValAspPheLysLeuSerProGlyPheProMet
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 TGAAACTCAACAGACTGGGACCCAAACCTAGATGCACTCTCTATGGCTGTTAATCAGAAGGTGTTCTTTAAGGGCTCAGGATACTGGCAATGGGA
 LysLeuAsnArgValGluProAsnLeuAspAlaAlaLeuTyrTrpProValAsnGlnLysValPheLeuPheLysGlySerGlyTyrTrpGlnTrpAsp
 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TGAACACTGACCAAGACTGACCTAGTCGGTACCCAAACCAATCAACGAACTTCACTGGAGTGCCAGACCAACCCCTAGCAGCTATGAGCTGGCAACGAT
 GluLeuThrArgThrAspLeuSerArgTyrProLysProIleLysGluLeuPheThrGlyValProAspGlnProSerAlaAlaMetSerTrpGlnAsp
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GCCCAAGTCTACTCTCAAGGGCAAAGAGTACTGGCCCTTAACCAAGCAACTTCGAGTCGGCAAGGGCTATCCCAGAAATACGACACACTGGATGGC
 GlyGlnValTyrPhePheLysGlyLysGluTyrTrpArgLeuAsnGlnGlnLeuArgValAlaLysGlyTyrProArgAsnThrThrHisTrpMetHisCys
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 GTAGCTCTGGACTCACAGACTAACTCATTAACGCGCATGTCGACCACTCTGCAACCGTGGATCTGGATGTCCTCTGCCACAGACCTG
 SerProArgThrProAspThrAsnSerLeuThrGlyAspValThrThrProAlaThrValGluSerValLeuAspValProSerAlaThrAspAlaAla
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CTCCCTCTCATCTCAGCTATGTCACCTTGCTAGGGGCTGAGAACTAGTCAGTGTCTGCTCCTTAGGGTTGCGAGATGGGACTTGTGACCTAGTGCC
 SerLeuSerSerAlaAsnValThrLeuLeuGlyAla***
 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CTAGATACTCCAATTCTGGATGCCACATTCCAGTGTCTAGAAAGTGAATGCTGCTTAATTCTGAGTCATTCCCCAGTCCCCATTCTCTTGTGTCATATGGC
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 TGTTTCAAGTGTGACATCTATTCTGGAGGGAAATTGTTGATCAGGACCCCCCCCCCCCCAGGGTCTCTCATAGCAGCTGGCTATGGTTATCG
 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 GCTATCTGAAACTGTGTTATGTAAGCTAACCTGAACTCACAGAAACCAACCTGCCCTGCCCCCTGICCTGAGTGTGGATTAAAAACCTG
 2010 2020 2030 2040 2050

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 48/00	A B L		A 6 1 K 48/00	A B M
	A B M			A B N
	A B N			A B S
	A B S			A B X

A B X	A C B
A C B	A C D
A C D	A C K
A C K	A C L
A C L	A C S
A C S	A C V
A C V	A D A
A D A	A D D
A D D	A D P
A D P	A D T
A D T	A D U
A D U	A D V
A D V	C O 7 H 21/04 B
C O 7 H 21/04	C O 7 K 14/47
C O 7 K 14/47	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 1/21	9/50
9/50	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/02	21/08
21/08	A 6 1 K 37/54
//(C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1:19)	
(C 1 2 N 9/50	
C 1 2 R 1:19)	
(C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:91)	